

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : B01J 19/00, C07H 21/00, C07K 1/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/35753 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. August 1998 (20.08.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/00901 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 1998 (17.02.98) (30) Prioritätsdaten: 197 06 089.7 17. Februar 1997 (17.02.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG MBH (GBF) [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). ABIMED ANALYSEN-TECHNIK GMBH [DE/DE]; Raiffeisenstrasse 3, D-40736 Langenfeld (DE). IMB INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). MATYSIAK, Stefan [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). SCHREUER, Olaf [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig (DE). GAUSEPOHL, Heinrich [DE/DE]; Raiffeisenstrasse 3, D-40736 Langenfeld (DE). ROSENTHAL, André [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).	(74) Anwälte: BOETERS, Hans, D. usw.; Boeters & Bauer, Bereiteranger 15, D-81541 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: AUTOMATED CHEMICAL SYNTHESIS DEVICE

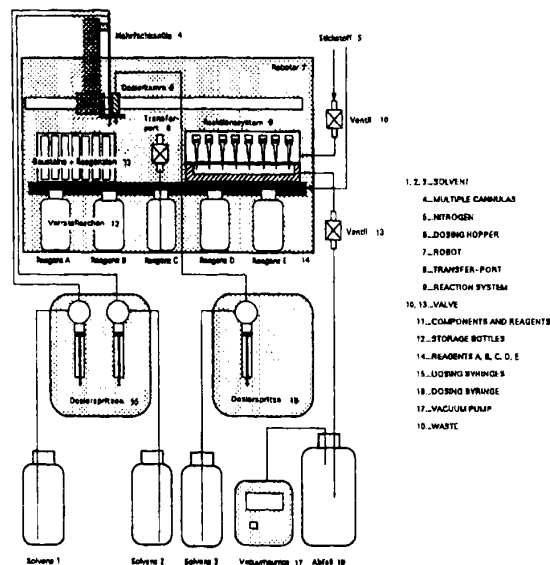
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG FÜR EINE AUTOMATISIERTE CHEMISCHE SYNTHESE

(57) Abstract

The disclosed synthesis system is based on the idea of designing a synthesis and treatment procedure, substrates and anchor groups which enable biomolecules to be simultaneously produced in an entirely automatic manner. By using a pipetting robot to dispense the reagents, the reaction column can be arranged in a format suitable for subsequent treatment. For a pipetting robot to carry out even water-sensitive or air-sensitive synthesis protocols, certain structural measures must be taken. The operation principle of the automaton and the synthesis sequence are described below as an example of a possible solution. The automaton can work with conventional substrates and reagents. Handling, however, is simplified by new, specially adapted substrates and anchor groups. A special, simultaneous purification and aliquot portioning process improves product quality and makes the device easier to use.

(57) Zusammenfassung

Dem erfindungsgemäßen Synthesesystem liegt nun der Gedanke zugrunde, Synthese, Träger, Ankergruppen und Aufarbeitungsprozedur für die simultane vollautomatische Herstellung von Biomolekülen auszulegen. Bei Verteilung der Reagenzien über einen Pipettierroboter können die Reaktionssäulen in einem für die weitere Bearbeitung geeigneten Format angeordnet werden. Um mit einem Pipettierroboter auch ein wasser- oder luftempfindliches Syntheseprotokoll durchführen zu können, müssen bestimmte konstruktive Maßnahmen ergriffen werden. Beispielhaft für eine mögliche Lösung werden im Folgenden das Funktionsprinzip des Automaten und der Ablauf einer Synthese beschrieben. Der Automat kann mit konventionellen Trägern und Reagenzien arbeiten. Die Handhabung wird aber durch speziell angepaßte, neu entwickelte Träger und Ankergruppen vereinfacht. Durch Anschluß eines speziellen Verfahrens für simultane Reinigung und Aliquotierung wird die Qualität der Produkte verbessert und die Verwendung vereinfacht.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VORRICHTUNG FÜR EINE AUTOMATISIERTE CHEMISCHE SYNTHESE

Die Synthese von polymeren Biomolekülen wie Oligonucleotide, Peptide oder unnatürliche Analoge dazu nach dem Prinzip der Festphasensynthese ist eine etablierte Technik (~~Anlage~~ 2).

Während multiple parallele Peptidsynthese in offenen Reaktionssystemen zum Stand der Technik gehört (~~Anlage~~ 14, ~~Anlage~~ 15), werden z.B. Oligonucleotide eher einzeln hergestellt. Das Hauptproblem der Oligonucleotidsynthese liegt in der extremen Wasserempfindlichkeit der zum Stand der Technik gehörenden Phosphoramiditchemie (~~Anlage~~ 2). Oligosyntheseautomaten sind daher geschlossene Systeme und arbeiten unter Schutzgas. Ein publiziertes Gerät zur parallelen Synthese von bis zu 96 Oligonucleotiden benutzt ein ebenfalls geschlossenes Reaktionssystem und eine Vielzahl von Ventilen zur Dosierung von Reagenzien (~~Anlage~~ 16). Hier werden konventionelle Träger und manuelle Prozeduren zur Aufarbeitung verwendet.

Dem erfindungsgemäßen Synthesesystem liegt nun der Gedanke zugrunde, Synthese, Träger, Ankergruppen und Aufarbeitungsprozedur für die simultane vollautomatische Herstellung von Biomolekülen auszulegen. Bei Verteilung der Reagenzien über einen Pipettierroboter können die Reaktionssäulen in einem für die weitere Bearbeitung geeigneten Format angeordnet werden. Um mit einem Pipettierroboter auch ein wasser- oder luftempfindliches Syntheseprotokoll durchführen zu können, müssen bestimmte konstruktive Maßnahmen ergriffen werden. Beispielhaft für eine mögliche Lösung werden im folgenden das Funktionsprinzip des Automaten und der Ablauf einer Synthese beschrieben.

Der Automat kann mit konventionellen Trägern und Reagenzien arbeiten. Die Handhabung wird aber durch speziell angepaßte, neu entwickelte Träger und Ankergruppen vereinfacht.

Durch Anschluß eines speziellen Verfahrens für simultane Reinigung und Aliquotierung wird die Qualität der Produkte verbessert und die Verwendung vereinfacht.

Insbesondere betrifft die Erfindung folgende Ausführungsformen:
Vorrichtung für eine automatisierte simultane chemische Synthese und Aufreinigung einer Vielzahl von Produkten an der Festphase sowie Trägermaterial und chemische Bausteine für die Festphasensynthese

dadurch gekennzeichnet, daß

1. eine Vielzahl (10 bis 1000, vorzugsweise 48 und ein vielfaches davon, vorzugsweise 400) von separaten, nach oben und unten offenen Reaktionsgefäßen als parallel in einem Block (~~Anlage 1/~~ Abb. 6) angeordnete Kanäle oder kleine Säulen vorgesehen werden, die entweder gemeinsam oder einzeln entnehmbar sind; in den Kanälen/Säulen das Trägermaterial für die Synthese (Festphase) entweder zwischen zwei inerte poröse Frittenböden (~~Anlage 11/~~) oder vorzugsweise selbst als chemisch modifizierter Fritten- oder Filterboden (~~Anlage 10/~~) eingebracht wird (~~Anlage 1/~~ Abb. 7), so daß von oben zugegebene flüssige Medien allein durch die Oberflächenspannung und Benetzung des Materials im Reaktor festgehalten werden.
2. der Reaktorblock nach 1. auf eine Wanne aufgesetzt wird, die über ein schaltbares Ventil an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist und so die flüssigen Medien aus den Reaktoren und den darin enthaltenen Trägermaterialien simultan abgesaugt werden können.
3. die oberen Eingänge der Reaktionssäulen im Reaktorblock nach 1. abgedeckt durch eine darüber angebrachte Lochblende (Prallblech) mit Inertgas (z.B. Stickstoff, Argon) geflutet werden können und der Inertgasstrom gegebenenfalls während des Absaugvorganges nach 2. deutlich erhöht wird; alternativ, der Raum über den Reaktionssäulen/-kanälen durch eine zweite, verschiebbare Lochblende gezielt verschlossen werden kann, um die Reagenzien mit Inertgasüberdruck aus den Reaktionssäulen/-kanälen auszublasen.
4. chemische Bausteine, Reagenzien und Lösungsmittel von einem xyz-Pipettierroboter über elektronisch steuerbare Dosierspritzen (Dilutoren) mit einer oder mehreren Dosiernadeln und gegebenenfalls zusätzlich einem oder mehreren Dosierkämmen auf die Reaktionsgefäße verteilt werden, so daß jeder Reaktor einzeln adressierbar ist.
5. die Dosiernadel nach 4. mit mehreren (mindestens zwei) an separate Dosierspritzen angeschlossenen, also getrennt befüllbaren inneren Kanälen ausgerüstet ist, deren Enden sich erst kurz vor dem Auslaß treffen (~~Anlage 1/~~ Abb. 8) und so bei simultaner Dosierung mehrerer Reagenzien die Mischung erst kurz vor der Abgabe in der Spitze der Dosiernadel erfolgt, wobei ein Kanal auch an die Inertgasversorgung angeschlossen sein kann und so über ein Inertgaspuls das Mischvolumen ausgedrückt werden kann.
6. die Dosiernadel nach 4. und 5. in der Längsachse federnd gelagert ist, um ohne Beschädigung auf das Trägermaterial oder die Deckfritten in den Reaktorkanälen aufsetzen zu können und so auch kleinste Volumina bis herunter zu 1 Nanoliter sicher absetzen zu können.
7. eine Vielzahl (zwei bis ein hundert, vorzugsweise 24) an chemischen Bausteinen und Reagenzien, gegebenenfalls in geeigneten Lösungsmitteln gelöst, in mit Septen verschlossenen Gefäßen, die in einem vom Reaktionsblock getrennten Reagenzienblock angeordnet sind, bereitgestellt werden.

8. die mit Septen verschlossenen Hälse der Gefäße im Reaktorblock nach 7. abgedeckt durch eine darüber angebrachte Lochblende (Prallblech) mit Inertgas (z.B. Stickstoff, Argon) geflutet werden können.
9. Reagenzien mit der Dosiernadel nach 4. und 5. auch aus Transferports entnommen werden können, die entweder direkt oder über schaltbare Ventile mit Vorratsflaschen verbunden sind (~~Anlage 1/~~ Abb. 6) und diese Vorratsflaschen unter einem geringen Überdruck an Inertgas stehen.
10. Lösungsmittel und Reagenzien aus Solventflaschen mittels Dosierspritzen oder durch Inertgasüberdruck auch über einen oder mehrere Dosierkämme nach 4. simultan auf mehrere Reaktoren reihenweise verteilt werden können
11. das Trägermaterial nach 1. eine Schicht im Reaktorkanal bildet, die gleichmäßig von den oben aufgegebenen Reagenzien und Lösungsmitteln allein durch die Schwerkraft durchströmt wird. Nach dem zum Stand der Technik gehörenden Prinzip der Festphasensynthese (~~Anlage 2/~~ Abb. 2) werden so die einzelnen Produkte je Reaktor kovalent fixiert auf der Oberfläche des Trägermaterials und parallel durch eine Abfolge von Pipettieroperationen schrittweise aufgebaut. Während aller Syntheseschritte (Aufbaureaktionen, repetitive Schutzgruppenabspaltungen und Waschoperationen) bleiben die Produkte am Trägermaterial kovalent verknüpft und werden erst in einem oder mehreren letzten Reaktionsschritten vom Trägermaterial abgespalten und in Lösung gebracht.
12. die chemischen Bausteine (Monomere), die für den Aufbau der Produkte eingesetzt werden, als ASCII Lettern codiert sind und die Produkte so als Abfolge von Aufbaureaktionen (Monomereinbaureaktionen) durch ASCII Worte beschrieben sind; die Gesamtheit aller Produkte für ein Syntheseprogramm ist somit eine Liste von ASCII Worten, die von einer geeigneten Software auf einem Steuerungsrechner in Ventilschaltungs-, Dosierspritzenbewegungs- und Roboterarmbewegungsoperationen umgesetzt wird, wobei jeder Monomereinbau aus einer Folge von mehreren Reaktionsschritten und Schaltungsoperationen bestehen kann (~~siehe Anlage 3/~~).
13. für die kovalente Verknüpfung der Produkte mit dem Trägermaterial nach 11. geeignete Verknüpfungsbausteine (Linker) vorgesehen werden, die eine selektive und schonende finale Abspaltung der Produkte erlauben (~~Anlage 1/~~ Abb. 1). Vorzugsweise wird für die Synthese von oligomeren Verbindungen wie Oligonucleotide, Peptide usw. ein "universeller" Linker (~~Anlage 4 und 5/~~) vorgesehen, an den auch die Bausteine der ersten Aufbaureaktion mit dem gleichen chemischen Reaktionstyp verknüpft werden können, der auch für die weiteren Aufbaureaktionen eingesetzt wird, wodurch für die ganze Synthese einer Verbindungsklasse nur ein Typ von Bausteinen gebraucht wird (z.B. nur Nucleosid-3'-phosphoramidite für die Synthese von 3'-OH-Oligonucleotiden).
14. vorzugsweise der Linker nach 13. bei den finalen Abspaltungsreaktionen erst in eine labile aber noch intakte Form überführt wird (safety-catch Linker), die dann durch eine milde chemische Behandlung, vorzugsweise eine pH-Veränderung, gespalten wird (~~Anlagen 5 bis 8/~~). Mit einem solchen Linkertyp lassen sich die kovalent fixierten Produkte einfach durch automatische Waschoperationen am Trägermaterial von chemischen Reagenzien reinigen und erst ganz zum Schluß aus den Reaktoren in eine der Reaktorordnung komplementären Anordnung von Auffanggefäßen eluieren (~~Anlage 1/~~ Abb. 9).

anordnung komplementären Anordnung von Auffanggefäßen eluieren (~~Anlage 1/~~ Abb. 9).

15. die Zielprodukte der Synthesen mit einer als Affinitätslabel nutzbaren Gruppe versehen sind, über die die Zielprodukte an eine entsprechende Affinitätsphase gebunden werden können (~~Anlage 9/~~). Damit werden die aus den Reaktoren eluierten Produkte in eine der Reaktoranordnung komplementären Anordnung von Affinitätssäulen (~~Anlage 1/~~ Abb. 9) überführt und durch einfache automatisierte Waschoperationen von Nebenprodukten gereinigt. Nachfolgend werden die Zielprodukte durch einfache automatisierte Wasch- oder Abspaltungsoperationen aus den Affinitätssäulen in eine der Reaktoranordnung komplementären Anordnung von Auffanggefäßen eluiert.
16. die Bindungskapazitäten der Affinitätssäulen nach 15. so limitiert sind, daß auch bei unterschiedlichen Synthesearausbeuten je Reaktor eine gleiche Mindestmenge an Zielprodukt gebunden und eluiert wird, damit alle Produkte einer multiplen Synthese in äquimolaren Mengen erhalten werden.

beispielhaft
Auf der Arbeitsfläche eines Pipettierroboters sind angeordnet:

- Ständer für Derivatelösungen, evtl. unter Schutzgas mit Septum
- Entnahmeports für Reagenzien, hier durch Ventile schaltbar
- Reagenzienflaschen unter Schutzgas
- Halterung für Reaktionssäulen

Die Reaktionssäulen bestehen aus Kunststoffröhrchen mit eingesetzten Fritten, die den eigentlichen Syntheseträger einschließen, den Träger in einer definierten Position fixieren oder selbst als Träger derivatisiert wurden. Als Röhrchen wurden hier handelsübliche Pipettenspitzen verwendet. Alternativ ist die Verwendung eines zusammenhängenden Spritzgußteils möglich, das einzelne Kavitäten mit Filterfritten enthält (z.B. von PolyFiltronics, Rockland, MA, USA, erhältlich).

Das Reaktionssystem *dann* wird im oberen Teil mit Schutzgas gespült. Eine Lochblende *hervor* als Abdeckung *verbindet* auch bei kleinem Volumenstrom das Eindringen von Luft. *verbindet*

Der untere Teil des Reaktionssystems kann zur Absaugung der Reagenzien mit Vakuum beaufschlagt werden. In einer alternativen Anordnung kommt eine zweite, verschiebbare Lochblende zur Anwendung. Damit lassen sich die Löcher bei Bedarf verschließen und die Reaktionssäulen durch einen Überdruck von Schutzgas ausblasen.

Zur Dosierung von Reagenzien ist der Roboter mit einer Kanüle versehen, die mindestens zwei unabhängige Kanäle aufweist. Diese Kanäle treffen sich erst sehr kurz vor dem Auslaß. Über angeschlossene motorbetriebene Dosierspritzen lassen sich Reagenzien separat aufnehmen und simultan abgeben. Im einfachsten Fall besteht die Kanüle aus zwei konzentrisch angeordneten Rohren (vgl. Abbildung). Die Kanüle ist in der Längsachse federnd gelagert, um auch kleinste Volumina bis herunter zu 1 µl ohne Beschädigung der Trägerfritten auf diesen absetzen zu können.

Um die Synthesegeschwindigkeit zu erhöhen, kann eines oder mehrere der Reagenzien und Lösungsmittel auch über einen Verteilerkamm dosiert werden. Dieser Verteilerkamm wird entweder auch über eine Dosierspritze bedient, oder er ist über Ventile mit einem oder mehreren Vorratsbehältern unter Überdruck anschließbar. Der Verteilerkamm dosiert Reagenzien immer simultan auf eine Reihe von Reaktionssäulen. Die Synthese besteht nun aus einer Reihe von programmgesteuerten Übertragungen von Reagenzien und Lösungsmitteln aus den Vorratsbehältern in die Reaktionssäulen. Syntheseablauf und Art der Reagenzien sind im Prinzip bekannt und Stand der Technik.

Die Synthese beginnt mit der Festlegung der Sequenzen als Liste von ASCII-Zeichenketten im steuernden Computerprogramm. Der Syntheseablauf wird als Abfolge von Arbeitsschritten mit Angabe der Reagenzien, der jeweils zu übertragenden Volumina und der einzuhaltenden Reaktionszeiten definiert. Ein Beispiel für ein Ablaufprogramm ist im Anhang angegeben.

Das Gerät wird dann mit den notwendigen Reagenzien und Syntheseträgern bestückt. Konventionelle Träger nach dem Stand der Technik erfordern die Zuordnung zu den einzelnen Sequenzen, da der erste Baustein außerhalb des Geräts separat aufgebracht werden muß. Eine Vereinfachung erreicht man durch den Einsatz des erfindungsgemäßen universellen Trägers, bei dem der erste Baustein im Syntheseautomaten gekuppelt wird. Die Chemie dazu ist in der Anlage beschrieben.

Die Synthese beginnt typischerweise mit einem Waschschrift, der vorzugsweise über den Verteilerkamm ausgeführt wird. Zum Entfernen der Lösungsmittel wird das Absaugventil für eine bestimmte Zeit geschaltet und der untere Teil des Reaktionssystems mit Vakuum beaufschlagt. In dieser Zeit wird der Schutzgasstrom zum oberen Teil deutlich erhöht, um das Eindringen von Fremdluft weitgehend zu verhindern. Anschließend wird typischerweise eine Lösung zur Abspaltung der temporären Schutzgruppen über die Kanüle verteilt, z.B. Trichloressigsäure in Acetonitril. Die Kanüle wird zunächst in den geschlossenen Transferport gefahren, der gegen die Außenseite der Kanüle dicht abschließt. Dann wird das Ventil geöffnet und das Reagenz in einen der Kanäle der Kanüle aufgezogen. In der Regel wird mehr als die benötigte Menge aufgezogen, da es im Grenzbereich im Schlauch zwischen Kanüle und Dilutor zu Vermischungen kommen kann. Der Grenzbereich zwischen den Flüssigkeiten wird in der Regel durch eine zusätzlich aufgezoogene Luftblase definiert. Das Ventil wird wieder geschlossen, und die Kanüle fährt die erste Reaktionsäule an. Die Kanüle wird gegebenenfalls auf der oberen Fritte oder dem Träger selbst aufgesetzt und das erste Aliquot des Reagenzes abgegeben. Die weiteren Positionen werden analog angefahren.

Anschließend wird der Überschuß im Schlauch verworfen und die Kanüle gespült.

Bei Reagenzien, die gemischt werden müssen, z.B. zur Aktivierung der Monomerbausteine, wird zunächst wie beschrieben eines der Reagenzien aufgenommen. Anschließend wird das zweite (und gegebenenfalls weitere) Reagenz in den zweiten Kanal der Kanüle aufgesaugt. Um schon für die erste Dosierung eine korrekte Mischung zu liefern, wird ein Teil des Überschusses zu Beginn durch gleichzeitiges Betätigen beider Dilutorspritzen verworfen. Die Kanüle fährt dann auf die vom Programm vorgegebenen Positionen, setzt auf der Fritte auf und dosiert das Reaktionsgemisch durch gleichzeitiges Betätigen der Dilutorspritzen. Dieses Verfahren ist der entscheidende Schritt der Synthese: Durch die Trennung der Reagenzien bis zur Dosierung auf den Träger wird die Konkurrenzreaktion zur Kupplung, die Hydrolyse durch Spuren von Wasser, verzögert. Damit ist die Synthese in einem eigentlich zur Atmosphäre offenen Reaktionssystem entgegen der vorherrschenden Meinung von Fachleuten doch möglich.

Der weitere Syntheseablauf besteht aus einer Abfolge ähnlicher Schritte mit wechselnden, vom Programmablauf festgelegten Reagenzien.

Im Anschluß an die Synthese erfolgt die bekannte Entschützung und Abspaltung der Produkte vom Träger, z.B. durch Inkubation mit konzentrierter Ammoniaklösung.

Alternativ läßt sich ein erfindungsgemäßer „Safety-Catch-Linker“ verwenden, der bei Abspaltung der Schutzgruppen erhalten bleibt und lediglich in einen labileren Zustand gebracht wird. So können alle Reagenzien und Nebenprodukte ausgewaschen werden, bevor in einem separaten Schritt die Syntheseprodukte vom Träger abgespalten werden. Der Einsatz des Safety-Catch-Linkers erleichtert die Syntheseaufarbeitung erheblich, da Ammoniak und Nebenprodukte leichter abgetrennt werden können als es bisher möglich war.

Die Aufarbeitung wird ebenfalls erleichtert durch die Anordnung der Reaktionsgefäße in einem Standardformat, z.B. dem von Mikrotiterplatten.

Da die Reaktionen während der Synthese niemals vollständig ablaufen, ist es durchaus üblich, wenn auch nicht immer notwendig, die Produkte zu reinigen. Hier bietet sich das von Blöcker und Frank beschriebene Verfahren (~~Anlage 9 A~~) an. Alternativ lassen sich auch andere bekannte Affinitätsreinigungen anwenden, z.B. über die Interaktion von Biotin und Avidin (~~Anlage 17~~) (~~17 A~~, ~~17 B~~).

Die meisten Anwendungen erfordern eine relativ genau bestimmte Menge an Syntheseprodukt. Im Fall der Oligonucleotide für Sequenzierreaktionen ist das nur ein Bruchteil der Syntheseausbeute. Hier läßt sich die Ausbeute über alle Syntheseansätze erfindungsgemäß durch Verwendung einer limitierenden Menge an Affinitätsmatrix nivellieren. Die Menge an Affinitätsmatrix wird gut definiert und in jedem Fall deutlich mehr markiertes Syntheseprodukt aufgegeben als der Bindungskapazität entspricht.

Die anschließend eluierten Mengen an Syntheseprodukt sind dann in etwa gleich (~~Anlage 9 B~~). Die Kombination von Affinitätsreinigung und Aliquotierung ist neu und erspart aufwendige Konzentrationsmessungen.

Durch den modularen Aufbau des Syntheseautomaten wird es möglich, Synthese, Abspaltung, Reinigung und Aliquotierung in einem Gerät zu vereinen. Bei Anwendung des Verfahrens nach ~~Anlage 9 A~~ kann ein Affinitätsträger aus Polymermaterial, **HEP** z.B. Polystyrol, Polyethylen oder Modifikationen davon, benutzt werden. Das Mate-**0174525** rial kann so gewählt werden, daß es gegenüber der Synthese und Schutzgruppenabspaltung inert ist. Es läßt sich dann sogar als Fritte unter dem Syntheseträger anordnen, was die Aufarbeitung gegenüber dem Stand der Technik erheblich vereinfachen würde.

A) Chemische Voraussetzungen zur hochparallelen DNA-Synthese

Das Arbeitsprinzip des konzipierten multiplen Syntheseautomaten sieht ein Raster von einfachen kleinen Reaktoren vor, in denen kleine poröse Membranfritten das Trägermaterial für die Synthese darstellen. Der Synthesemaßstab je Reaktor soll an die Anwendung als Sequenzier-Primer optimal angepaßt sein und im Bereich 1 bis 10 nanomol liegen. Das Konzept zur chemischen Derivatisierung des Trägermaterials für den Einsatz zum schrittweisen Aufbau von Oligonucleotiden ist in Abbildung 1 dargestellt.

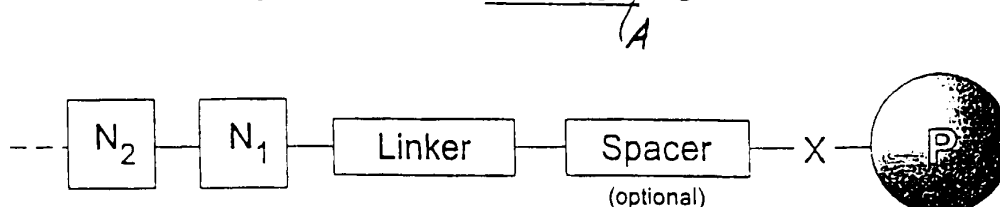


Abbildung 1: Molekulare Module für die Festphasensynthese von Oligonucleotiden. P = polymeres Trägermaterial; X = chemische Funktion zur Verankerung (-O- oder -NH-); Spacer = Abstandshalter; Linker = Einheit zur reversiblen Verankerung des 1. Nucleotidbausteins; $N_{1,2}$ = Nucleotidbausteine.

Es wurden zunächst ausreichend empfindliche Detektionsreaktionen etabliert, um die einzelnen Derivatisierungsschritte quantitativ im nanomol-Maßstab verfolgen zu können:

- für Hydroxylfunktionen: Tritylierung mit Dimethoxytritylchlorid in Pyridin gefolgt von der sauren Detritylierung mit Dichloressigsäure in Dichloethan und photometrische Bestimmung des Dimethoxytritylkations.
- für Aminofunktionen: Anfärbung mit dem anionischen Farbstoff Bromphenolblau in

Dimethylformamid gefolgt von der basischen Dissoziation und photometrischen Bestimmung des Bromphenolblau-Anions.

Verschiedenste, kommerziell erhältliche Membranmaterialien auf Polyolefinbasis wurden dann auf Eignung untersucht. Je nach Herstellung weisen diese Materialien schon eine unspezifische oxidative Alterung der Oberfläche mit Hydroxyl-, Keton-, Aldehyd- und Carboxylgruppen auf (Abbildung 2). Daher wurde eine Prozedur entwickelt, die diese Polymeroberfläche zunächst reduktiv "säubert" und anschließend durch selektive und leicht steuerbare Oxidation ausschließlich die hier gewünschten Hydroxylgruppen generiert (Abbildung 3). Damit kann jetzt Frittenmaterial mit vorbestimmter und für den Einsatz zur Oligonucleotidsynthese geeigneter Funktionalität hergestellt werden. Eine Vielzahl von chemischen Umsetzungen dieser sowie auch anderer hydroxylierter Materialien (z.B. Cellulosepapiere) wurde durchgeführt, um geeignete "Spacer" und "Linker" anzubringen (Abbildung 4). Die so erhaltenen Fritten wurden in einem kommerziellen Synthesearomaten für Oligonucleotidsynthesen erfolgreich eingesetzt (Abbildung 5) und stehen jetzt für Tests im Reaktormodul des neuen Automaten zur Verfügung.

Idealerweise sollte das nach Abbildung 1^A vorbereitete Trägermaterial (Träger-Spacer-Linker) universell für jede Oligonucleotidsequenz einsetzbar sein, so daß keine individuelle Konfigurierung des Syntheserasters notwendig ist. Dies ist durch die konventionelle Beladung in einer separaten Reaktion mit 3'-Nucleosidsuccinaten nicht gegeben (jede Sequenz erfordert einen der vier verschiedenen beladenen Träger). Deshalb soll ein universeller "Linker" implementiert werden, auf dem die Oligonucleotidsynthese direkt mit einem ersten Nucleotidbaustein beginnen kann. Das Konzept der intramolekular spaltbaren Phosphodiester nach Köster und Heyns (Tetrahedron Letters 1972, 1531) bzw. Gough et al. (Tetrahedron Letters 1983, 5321) wurde hierfür herangezogen und geeignete Linkerbausteine hergestellt und am Trägermaterial verankert (Abbildung 4, Verbindungstyp 3). In Modellsynthesen konnte erfolgreich gezeigt werden, daß das Konzept funktioniert.

Ein weiterer Aspekt der konzipierten Synthesetechnologie ist die integrierte parallele Reinigung und Lagerung der Oligonucleotide. Durch Verwendung einer eigens dafür zu entwickelnden "safety-catch"-Verankerung auf der Trägeroberfläche soll eine trägerfixierte Entschüttung und Reinigung realisiert werden. Hierfür wurde ein chemisches Konzept entwickelt, das eine Modifikation des universellen Linkers darstellt (Abbildung 4, Verbindungstyp 3). Entsprechende Modellverbindungen wurden hergestellt, mit denen das Konzept erfolgreich auf Funktionsfähigkeit überprüft wurde.

B) Experimentalversion einer DNA-Synthesemaschine

Eine erste Version des Gerätes wurde anhand des ursprünglichen Konzeptes aufgebaut und die notwendige Steuerungssoftware extern erstellt (Abbildung 6 ~~1-1-1~~ 9)

c) Beispiele für

Quantifizierung (und Reinigung) der produzierten Oligonucleotide

Je nach Basensequenz der synthetisierten Oligonucleotide erhält man unterschiedliche Gesamtausbeuten. Das folgende Verfahren ermöglicht es, eine einheitlich definierte Menge der verschiedenen Oligonucleotide zu erhalten. Gleichzeitig werden die Oligonucleotide dabei gereinigt.

1. Als Material für die Quantifizierung dient ein hydrophobes Polyolefin-Pulver (PE, PP oder PTFE). Definierte Mengen dieses Pulvers werden in Sterilfilter-Spitzen (Fa. Eppendorf) oder in entsprechende Spitzen mit Fritten gegeben (z.B. 20mg, 10 mg, 5 mg oder 2,5 mg). Vorbereitet wird das Pulver durch Waschen mit Acetonitril (je 3 x 250 µl) und anschließend mit 1M Triethylamin-Acetat-Puffer (TEAA) (je 3 x 250 µl).
2. Die mit dem PRIME96-Syntheseroboter dargestellten Oligonucleotide, die noch die hydrophobe Trityl-Schutzgruppe besitzen, werden vom Träger abgespalten. Man erhält so die Lösung A (In diesem Beispiel: 200 µl 33% NH₃-Lösung). Diese Lösung A wird 1:1 mit Wasser verdünnt und auf die vorbereiteten Säulen gegeben und langsam mit Hilfe einer Spritze durchgedrückt.
3. Es wird mit 2,5 % NH₃ (aq) (je 3 x 250 µl) und Wasser (je 3 x 250 µl) gespült.
4. Die Trityl-Schutzgruppe wird nun mit 2% Trifluoressigsäure (aq) (je 3 x 250 µl) abgespalten. Nach 5 Min. wird mit Wasser (je 3 x 250 µl) gespült.
5. Eluiert wird das quantifizierte und gereinigte Oligonucleotid mit 20% Acetonitril (aq) (je 3 x 250 µl).

Beispiel:

Aufgetragen wurden 7,2 OD (ca. 40 nmol) eines gemischten 18'mers

mg Quantifizierungs- Harz *	Auftragseluat (OD ₂₆₀)	TFA-Eluat (OD ₂₆₀)	Endprodukt (OD ₂₆₀)	Wiederfindungs- rate (%)
2,5	5,5	0,9	0,427	94
5	5,22	0,9	0,968	98
10	4,3	0,7	1,93	95
20	3,32	0,4	2,68	88

Als „Faustformel“ ergibt sich aus dieser Testreihe, daß ca. 1 nMol Oligonucleotid pro mg Quantifizierungsharz gebunden wird.

Die Quantifizierung beruht darauf, daß eine definierte Menge des zunächst noch tritylierten Oligonucleotids pro mg des eingesetzten Reinigungsmaterial gebunden wird. Da die Menge des mit dem PRIME96 jeweils synthetisierten Oligonucleotids stets größer ist, als die Menge, die vom Reinigungsmaterial gebunden werden kann, ist so auf einfache Weise eine Quantifizierung möglich.

* Micropore, BTL Technologies, San Raffael CA, USA

D) Beispiel für

/Anlage 10: /
Trägermaterial für die Festphasensynthese
mit dem PRIME96-Syntheseroboter

/ein am

Innovatives Konzept:

Unser innovatives Synthesekonzept basiert darauf, daß die verschiedenen Reaktionslösungen allein durch Kapillarkräfte an einem festen Träger haften und mit diesem reagieren können. Dabei kann also so auf anfällige und teure Ventilsysteme verzichtet werden. Dieses kann zum einen dadurch realisiert werden, daß man zwischen zwei inerte Fritten ein konventionelles Trägermaterial einbringt. Noch besser ist es jedoch, einen Träger zu entwickeln, der bereits eine definierte poröse Struktur besitzt, um diesen dann zu funktionalisieren. Das letztere Verfahren bietet dabei folgende Vorteile:

- kommerziell erhältliches Trägermaterial mit definiertem macroporösem Porendurchmesser
- reproduzierbare Herstellung
- große Oberfläche
- gute Durchströmungseigenschaften
- definierte Struktur
- mechanisch stabil
- = chemisch weitgehend inertes Grundmaterial, nur die Oberfläche wird derivatisiert

Ein derartiges neues Trägersystem haben wir hier entwickelt, wobei besonders die poröse Struktur des Ausgangsmaterials eine Funktionalisierung mit bekannten Verfahren ausschloß.

Funktionalisierung von Polyolefin-Fritten (am Beispiel von Polyethylen- und Polypropylen)

1) Reduktion

Bedingt durch den Herstellungsprozeß (Sinterung) sind die kommerziell erhältlichen Polyolefinfritten bereits oxidiert (Carboxy-, Carbonyl-, Hydroxyl-Gruppen). Um hier ein einheitliches Startmaterial herzustellen, ist zunächst eine Reduktion nötig. Dazu werden in einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler 50 mmol LiAlH_4 vorgelegt und 50 ml trockener Diethylether zugetropft. Danach werden 1 g PE-Fritten hinzugefügt und 6 h unter Rückfluß erhitzt. Hiernach wird zunächst mit feuchtem Ether der Überschuß von LiAlH_4 hydrolysiert und der Niederschlag mit 10% H_2SO_4 wieder aufgelöst. Es wird 3 x mit 100 ml Wasser, dann mit 2 x 100 ml 10% NaHCO_3 , danach wieder mit 3 x 100 ml Wasser und 1 x 100 ml MeOH gewaschen und im HV getrocknet.

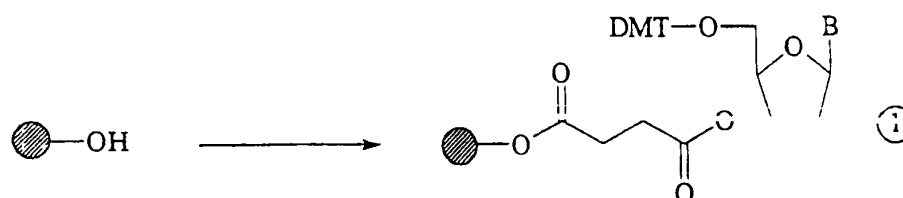
2) Direkte Hydroxylierung

1 g der reduzierten Polyolefin-Fritten werden zu einer Lösung von 10 ml H_2O_2 (30% aq) und 100 ml Trifluoressigsäure gegeben. Unter Rückfluß wird 15 bis 60 Min. erhitzt. Je nach Reaktionszeit ergeben sich Beladungen von 250 nmol OH/g (15 Min.) bis 5 μmol OH/g (60 Min.). (Die Beladung mit OH-Gruppen wurde über DMT-Kopplung bestimmt). Die hier verwendete Methode zur Hydroxylierung ist in der Literatur bis jetzt nur für Alkane und Cycloalkane beschrieben.

Die so hergestellten porösen hydroxylierten Träger sind universell für alle Festphasensynthesen einsetzbar.

3) Kopplung des ersten Bausteins (Startnucleosids) an den Träger

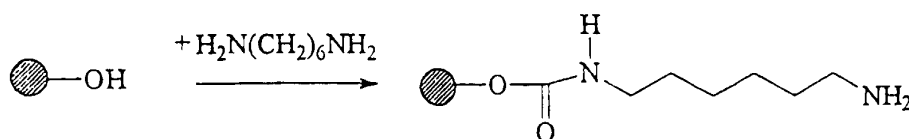
Beispiel 1 (s.a. Abb. 4, Anlage 1):



20 μmol DMT-dT^{an}-Succ werden in 100 μl DMF gelöst und 31 μmol N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DICD) zugemischt. Nach 10 Min. werden 25 μmol Methylimidazol zugemischt und 60 mg der hydroxylierten Polyolefin-Fritten (Darstellung s.o.) unter Stickstoff zugegeben. Nach 24 Stunden bei 25 C werden die Fritten nacheinander mit DMF, Pyridin und Methylenchlorid gewaschen..

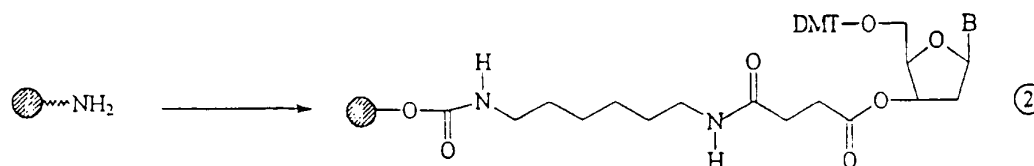
Beispiel 2: Einführung eines Spacers (s.a. Abb. 4, Anlage 1):

Einführung des Hexamethylen-Spacers:



In 5 ml einer 0.3 M Lösung von 1,1'-Carbonyldiimidazol in DMF werden 180 mg im HV getrocknete hydroxylierte Polyolefin-Fritten (Darstellung s.o.) unter Stickstoff 6 Stunden bei RT geschüttelt. Danach werden die Fritten 3 x mit je 50 ml DMF gespült und danach in 5 ml einer 0.3 M Lösung von 1,6-Diaminohexan in DMF 18 Stunden geschüttelt. Anschließend werden die Fritten mit DMF, Methanol, Aceton und Ether gewaschen und im HV bei RT getrocknet.

Kopplung des Startnucleosids:



Durchführung analog Beispiel 1, jedoch ohne Methylimidazol.

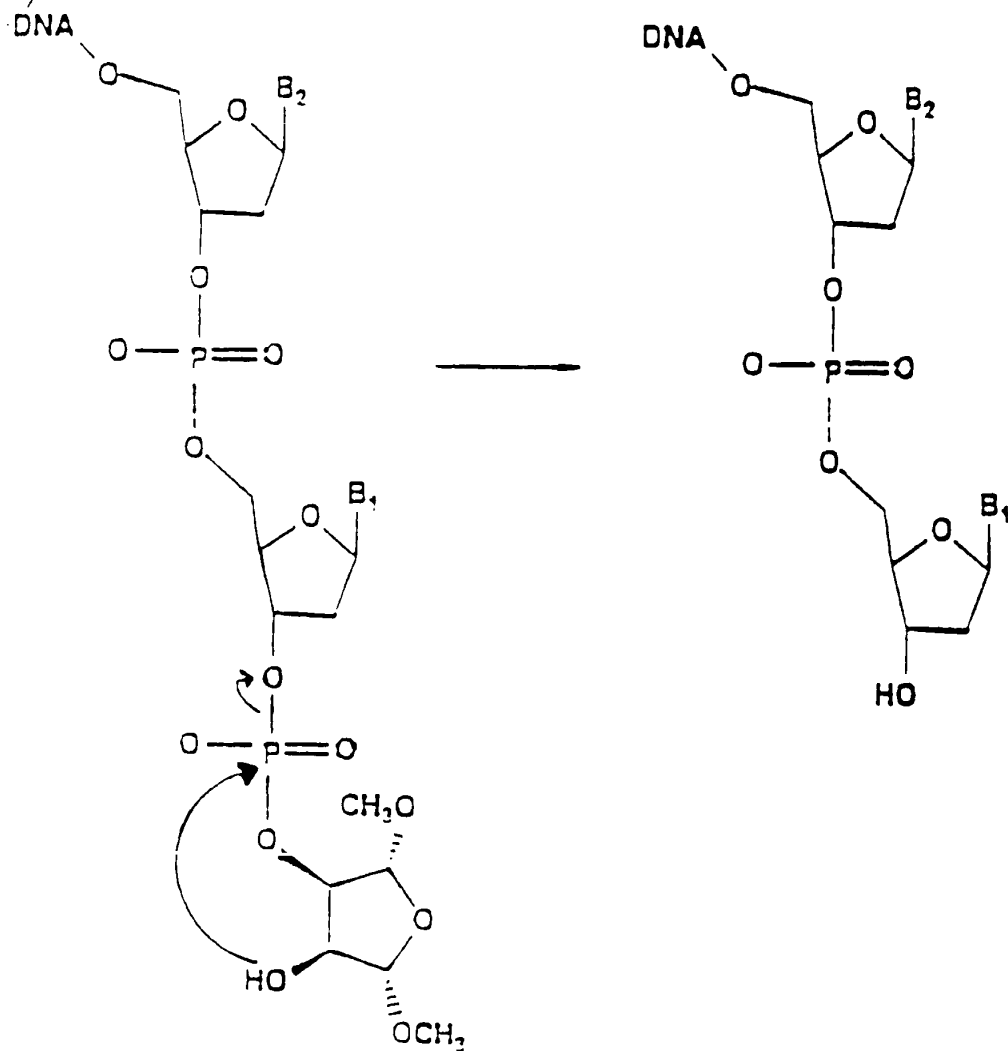
Funktionalisierung von PTFE

PTFE-Fritten werden mit Natriumnaphthalid behandelt und anschließend hydrolysiert. Bereits hier erhält man hydroxylierte PTFE-Fritten. Durch eine anschließende Hydroborierung kann man die Konzentration von Hydroxygruppen auf dem Träger noch erheblich steigern.

Weiteres Trägermaterial (im PRIME96 getestet)

- Cellulose (s. Anlage 12)
- kommerzielles Trägermaterial (Fa. Pharmacia) als Pulver zwischen zwei Fritten (s. Anlage 11)

Ej. stepwise for linker



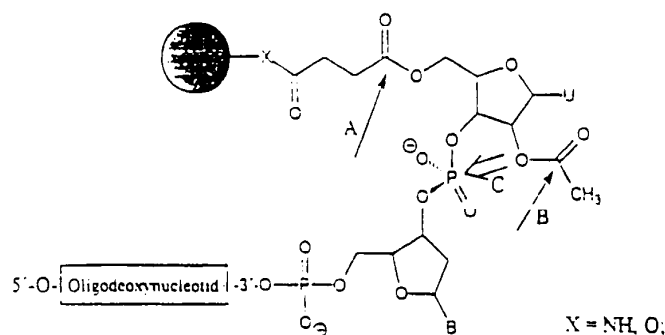
H. Köster and K. Heyns (1972) Tetrahedron Letters 1972, 1531

G.R. Gough, M.J. Brunden and P.T. Gilham (1983) Tetrahedron Letters 1983, 5321

S. Scott, P. Hardy, R.C. Sheppard and M.J. McLean (1994) In: Solid Phase Synthesis (R. Epton, Ed.) Mayflower Worldwide Ltd., Birmingham UK, pp 115

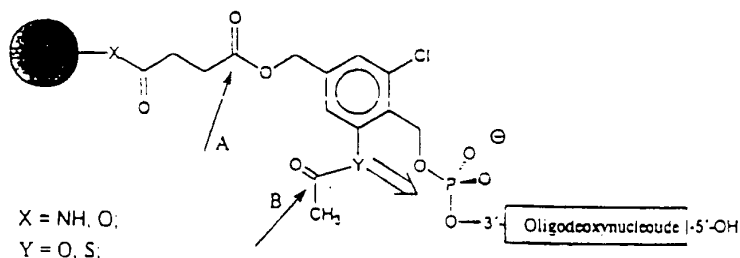
Neue universelle Linker für die Synthese von Oligonucleotiden an fester Phase (Phosphoramiditchemie):

Folgende Linkersysteme wurden hergestellt und getestet:



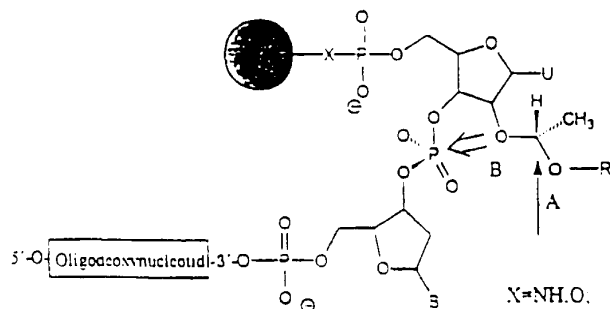
Typ 1a: Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Hydrolyse des Linkermoleküls:

A und B: schnelle Esterhydrolyse durch NH_3 oder LiOH ;
C: langsame Phosphodiestercyclisierung durch Säure oder Base;



Typ 1b: Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Hydrolyse des Linkermoleküls:

A und B: schnelle Esterhydrolyse durch NH_3 oder LiOH ;
C: beschleunigte Phosphodiestercyclisierung durch Säure oder Base;



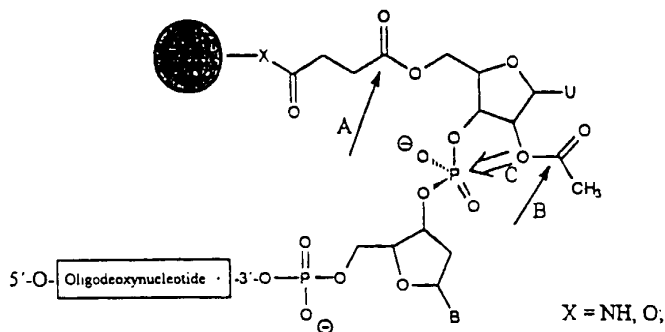
Typ 2: Irreversible Verankerung des Linkermoleküls auf der Festphase;

Abspaltung des Linkers durch 2-Stufenmechanismus:

A: schnelle saure Acetalhydrolyse (verd. $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$);

B: langsame Phosphodiestercyclisierung (LiOH);

Neue universelle Linker für die Oligonucleotid-Synthese (Phosphoramiditchemie):

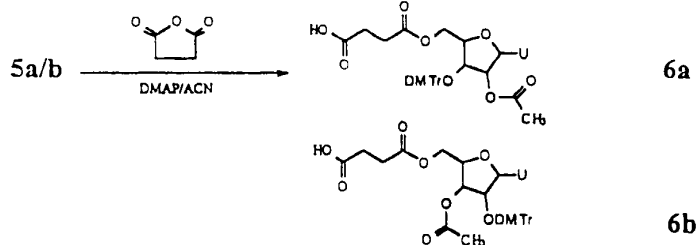
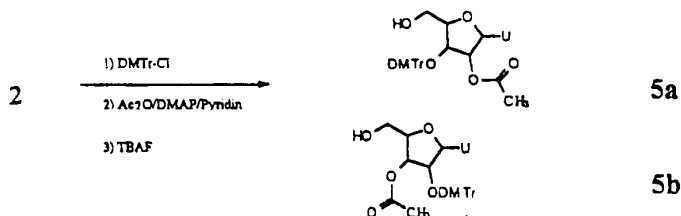
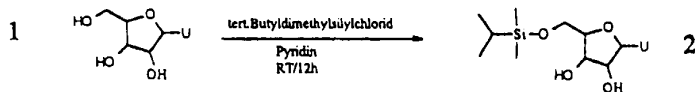


Typ 1a : Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Abspaltung des Linkers basisch.

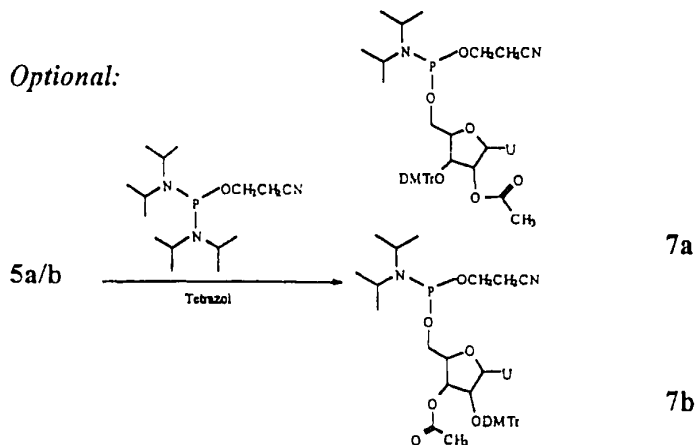
A und B (Schnelle Esterhydrolyse, NH_3 oder LiOH);

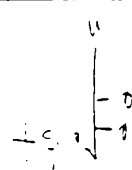
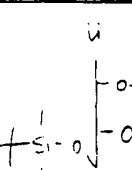
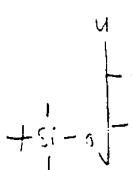
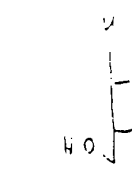
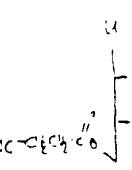
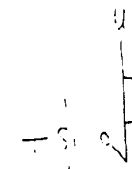
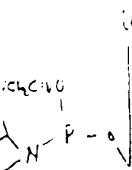
C (Langsame Phosphodiestercyclisierung, NH_3 oder LiOH);

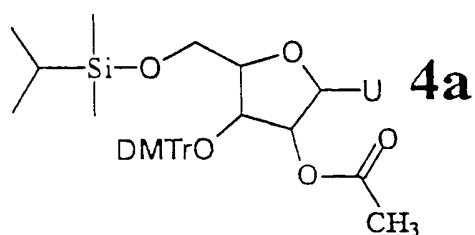
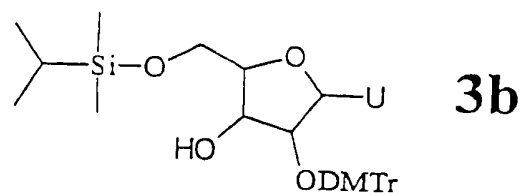
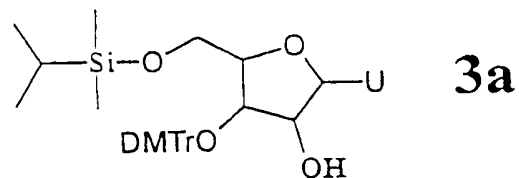
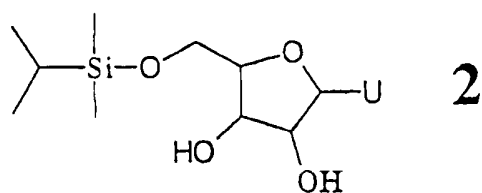
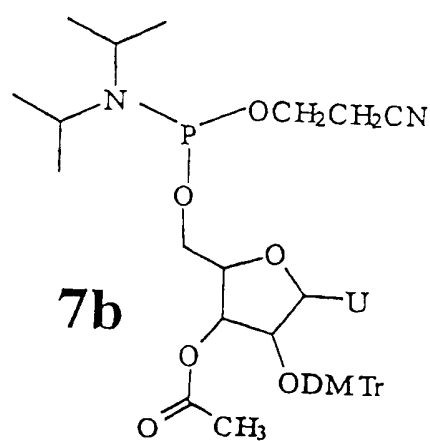
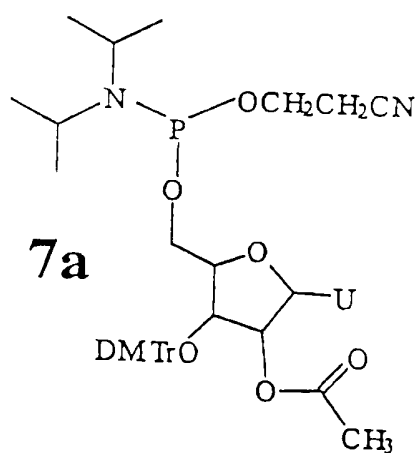
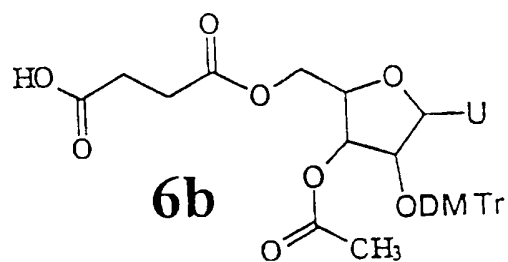
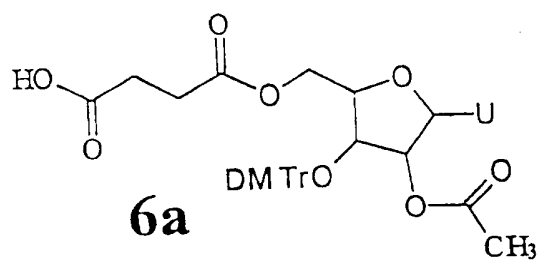
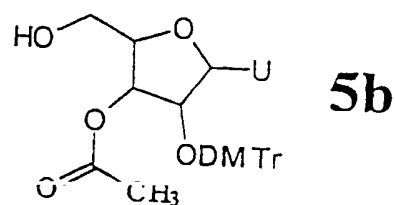
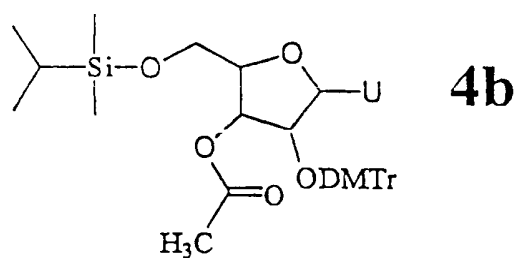
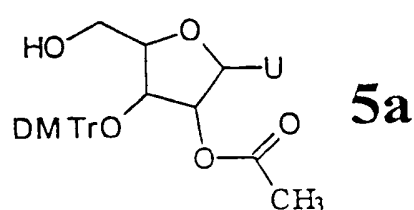
Synthese:

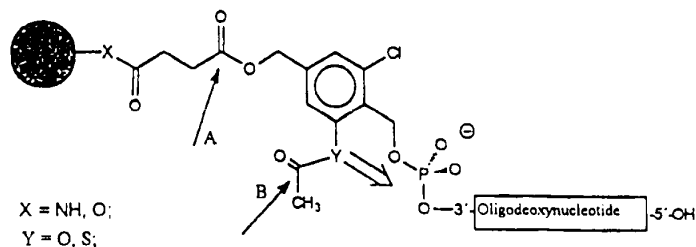


Optional:



Struktur	Summenformel	Molgewicht	Versuchsnummer	1 H	3 1 P	1 9 F	M S	E A	U V	Bemerkungen
②	 <chem>CSiH2(OH)NH2</chem>	$C_1H_5N_1O_1Si_1$ 73,12	V201	✓	-	-	338,17 ES/C	-	-	
③	 <chem>CSiH2(OH)Si(CH3)3</chem>	$C_4H_{10}O_1Si_2$ 160,27	V202	✓	-	-	360,17 MS/C	-	-	
④	 <chem>CSiH2(OH)OSi(CH3)3</chem>	$C_4H_{10}O_2Si_2$ 202,88	V203	✓	-	-	707,3 TMS/C	-	-	
⑤	 <chem>CSiH2(OH)OSi(CH3)3</chem>	$C_4H_{10}O_2Si_2$ 204,81	V204	✓	-	-	538,17 TMS/C	-	-	
⑥	 <chem>CSiH2(OH)OSi(CH3)3</chem>	$C_4H_{10}O_2Si_2$ 205	V205	✓	-	-	688,3 ES/C	-	-	
⑦	 <chem>CSiH2(OH)OSi(CH3)3</chem>	$C_5H_{12}O_2Si_2$ 263,21	V202	✓	-	-	967,6 ES/C	-	-	
⑧	 <chem>CSiH2(OH)OSi(CH3)3</chem>	$C_4H_{10}O_2Si_2$ 205,84	V206	✓	-	-	187,1 ES/C	-	-	

*oder*

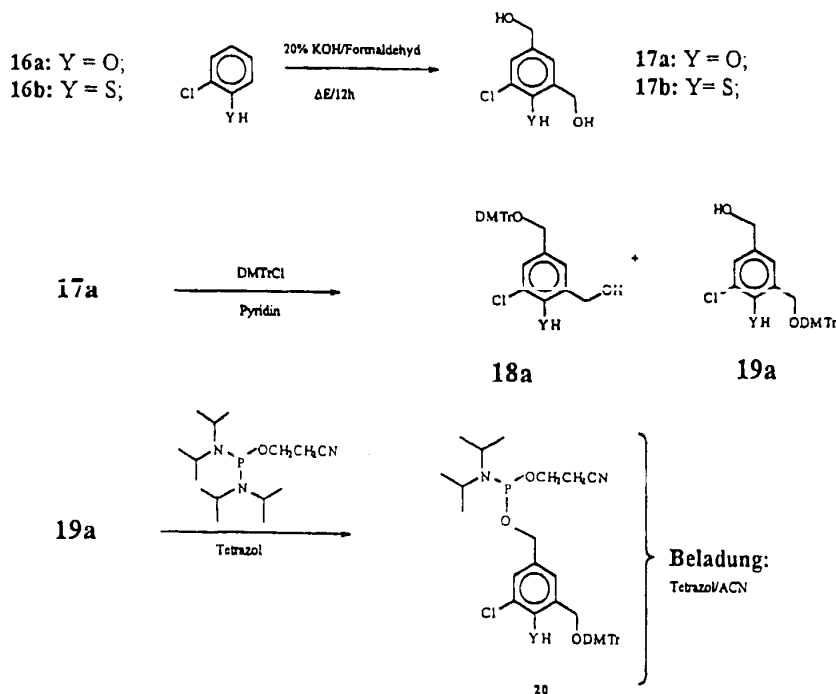


Typ 1b: Abspaltung vom Träger und gleichzeitige Abspaltung des Linkermoleküls:

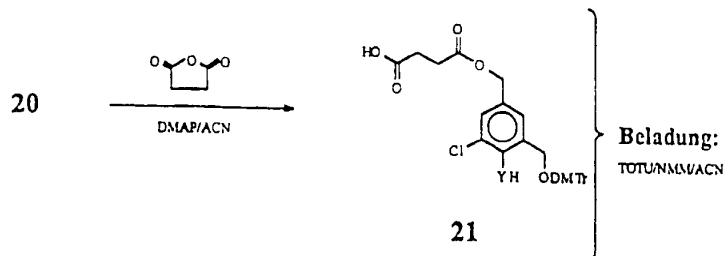
A und B (schnelle Esterhydrolyse, NH_3 oder LiOH);

C (beschleunigte Phosphodiestercyclisierung durch Phenolat- oder Thiophenolat-Bildung mit NH_3 oder LiOH)

Synthese:

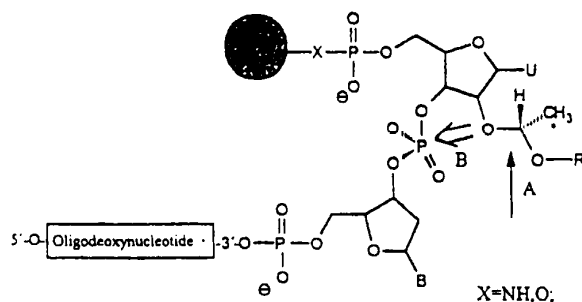


Optional:



Capping:

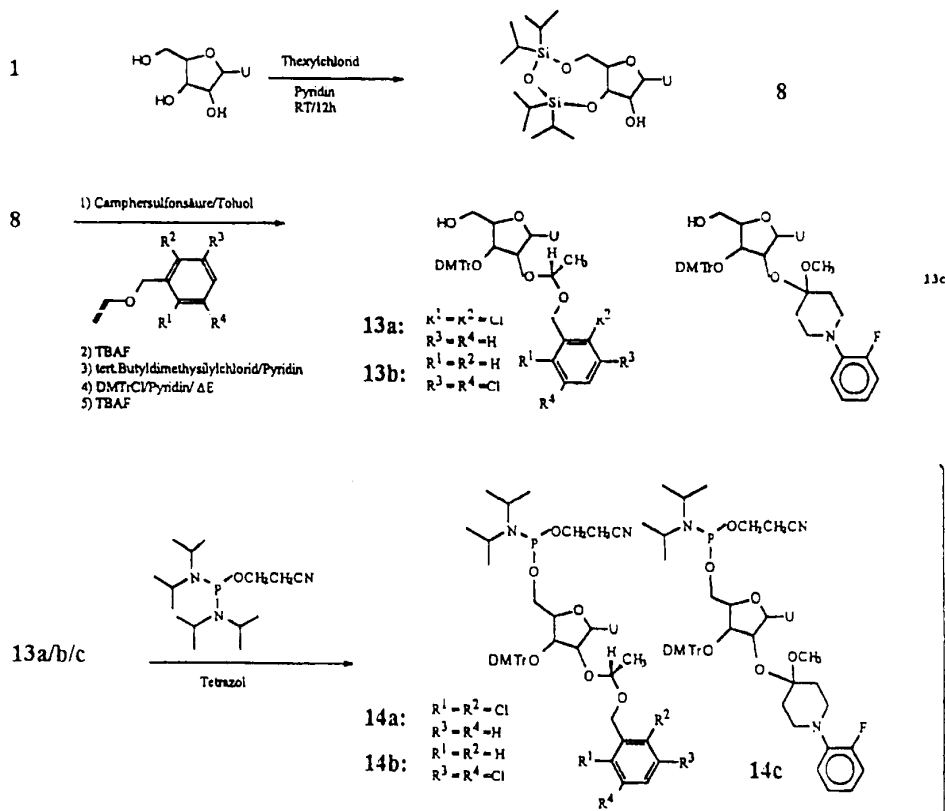
Nach Beladung des Trägermaterials erfolgt die Acylierung (Capping) der phenolischen HO- oder HS-Funktion durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid oder Pivaloylchlorid unter DMAP-Katalyse;



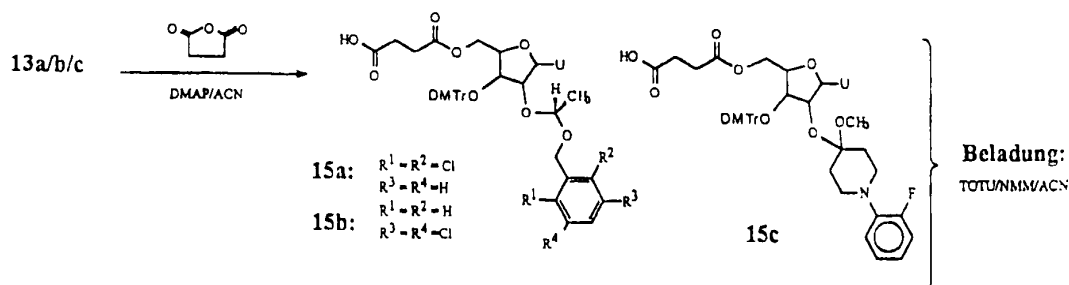
**Typ 2: Irreversible Verankerung des Linkermoleküls auf der Festphase;
Abspaltung des Linkers durch 2-Stufenmechanismus**

A: schnelle saure Acetalisierung (AcOH);
B: langsame Phosphodiestercyclisierung (LiOH);

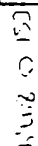
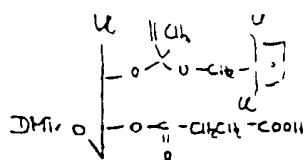
Synthese:



Optional:



Struktur	Summenformel	Molgewicht	Versuchsnummer	¹ H	³¹ P	¹⁹ F	M	E	U	Bemerkungen
	C ₃ H ₄ ₆ N ₂ O ₈ Si ₂ U ₂	689,72	V53	✓	-	-	-	-	-	9a
	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₈ Si ₂ U ₂	448,28	V62	✓	-	-	-	-	-	10a
	C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₈ Si ₂ U ₂	562,54	V64	✓	-	-	-	-	-	11a
	C ₄₅ H ₅₃ N ₂ O ₈ U ₂ Si ₂	864,91	V67	✓	-	-	-	-	-	12a
	C ₃₉ H ₃₈ N ₂ O ₈ U ₂	748,64	V69	✓	-	-	-	-	-	13a
	C ₄₈ H ₅₅ N ₄ O ₁₀ U ₂ P ₁	945,96	V72	✓	150,338 150,157 148,8535	1	ESI @ 948,1	-	-	14a
	C ₄₃ H ₄₂ O ₁₂ N ₂ U ₂	847,4	V268	✓	-	-	ESI @ 847,4	-	-	15a

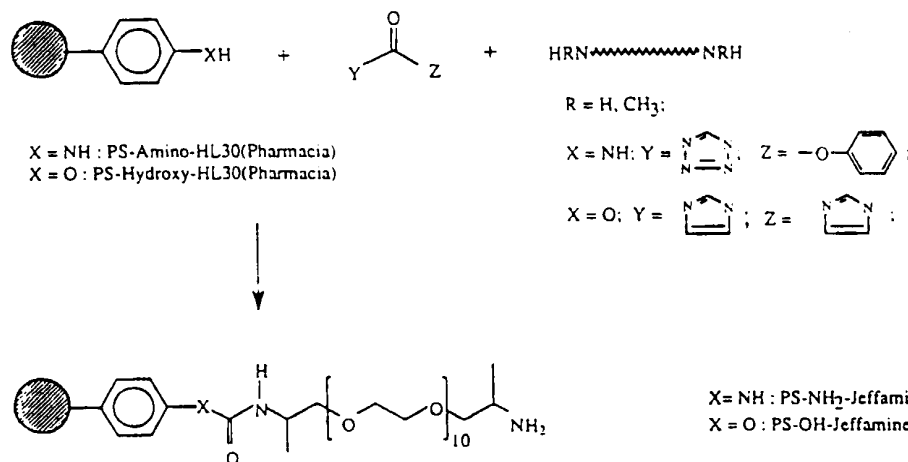


①		$C_{23}H_{46}$ N_2Si_2 O_2U_2	689,78	V53 P1	✓	-	-	-		Diastereomere gemant: 31
②		$C_{18}H_{30}$ $N_2O_2U_2$	448,28	V58	✓	-	-	-		106
③		$C_{24}H_{35}$ $O_2O_2U_2$ Si_2	562,54	V63	✓	-	-	-		116
④		$C_{14}H_{23}$ $O_2N_2O_2$ Si_2	267,91	V66	✓	-	-	-		126
⑤		$C_{39}H_{38}$ $H_2O_2U_2$	748,64	V68						136
⑥		$C_{48}H_{55}$ $N_4O_2U_2$ P.	949,86	V73	✓	150,541 150,541 149,149 149,149	-	ESI @ 946,6		146
⑦		-	1219,4	V90	✓	150,541 150,541 149,149 149,149	-	ESI @ 1219,4		Zusatz

Struktur	Summenformel	Molgewicht	Versuchsnummer	1 H	3 P	1 S	M S	E A	U V	Bemerkungen
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_7\text{N}_3\text{O}_7$	451,45	(nachdem Scarbund)	✓	—	✓	123,2279			10c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{OH} \end{array} $	$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{F}_7\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}_2$	565,71	V49 V70	✓	—	✓	123,2503			11c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{ODMTv} \end{array} $	$\text{C}_{48}\text{H}_{52}\text{F}_7\text{N}_3\text{O}_9\text{Si}$	868,02		✓	—	✓	123,4781			HPLC für Saubere - 37. 12c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{ODMTv} \end{array} $	$\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_9\text{F}$	753,62	V76	✓	—	✓	123,5	ESI 123,4		HPLC für Saubere - 17 13c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{ODMTv} \end{array} $	—	—	—							15c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{ODMTv} \end{array} $	$\text{C}_{51}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{F}_9\text{P}$	754,04	V99	✓	✓	✓	123,5161 123,6281			14c
$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OFPMP} \\ \\ \text{ODMTv} \end{array} $	$\text{C}_{61}\text{H}_{74}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{F}_9\text{P}_2\text{Si}_2$	1225,37	V85	✓	✓	✓	123,5161 123,6281	ESI 123,4		HPLC Saubere

F) Rezeptele für poröse Füllmaterialien

Reaktionsschema:

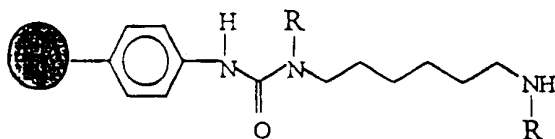


Name	X	Trägermaterial	Versuchsnummer	Beladungsnummer	Bedingungen	Capping	Beladungszahl
PS-NH ₂ -Jeffamine	-NH	PS-Amino-HL30	---	V224A	106mg (15,2 μmol) Träger; 18,5 mg (97,9 μmol) PCT Aktivierung: 18h/RT/1ml AcN; 1,75 mmol Jeffamine 500; 24h/RT +5h/60°C	---	---
PS-NH ₂ -Jeffamine	-NH	PS-Amino-HL30	---	V232A	510mg (73μmol) Träger; 163 mg (862 μmol) PCT Aktivierung: 17h/RT/5 ml AcN; 0,525 mmol Jeffamin 500; 2,5 h RT+5,5h/60°C	----	----
PS-NH ₂ -Jeffamine	-NH	PS-Amino-HL30	---	V238B3	1,024 g (145 μmol) Träger; 200 mg (1,053 mmol) Aktivierung: 24h/RT/20 ml AcN; 400 mg akt. Träger +300 μl Jeffamin 500/24h/60°C	10 ml DMF; 3 ml Pyridin; 0,5 ml Ac ₂ O; 15 min/RT;	BPB: 60 μmol/g
PS-OH-Jeffamine	-O	PS-Hydroxy-HL30	----	V232B	357 mg Träger; 137 mg CDI (844 μmol). Aktivierung: 17h/RT/5 ml AcN; 525 μmol Jeffamin 500; 2,5 h RT+5,5h/60°C	-----	BPB: 72μmol/g

Vorteile des Spacermoleküls:

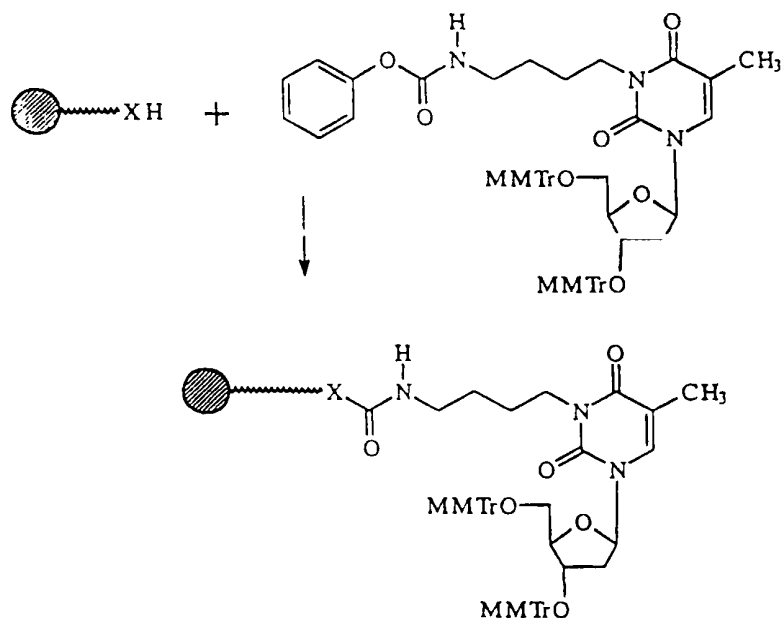
- Nach Aktivierung der Aminofunktion können die nicht umgesetzten Funktionen auf der Trägeroberfläche mit Essigsäureanhydrid gecappt werden. Mögliche Nebenreaktionen durch vicinale Hydroxyfunktionen (intramolekularer Ringschluß und Abspaltung vom Träger während der Ammoniakbehandlung) werden dadurch vermieden.
- Die Beladung kann durch Anfärben der nicht abreagierten basischen Aminofunktionen über den Bromphenolblau (BPB)-Test nach Aktivierung, Capping bzw. Aminolyse ermittelt werden.
- Durch die Verwendung von bisfunktionellen Aminopolyglykolspacern (z. B. Jeffamin 500) wird die hydrophobe Trägeroberfläche hydrophiler. Dies kann sich positiv auf die Reaktionsausbeuten bei der Oligomerensynthese auswirken (z.B. verringert sich die elektrostatische Aufladung, die hydrophilen Spacerarme ragen weiter in polare Lösungsmittel hinaus etc.)

Struktur:



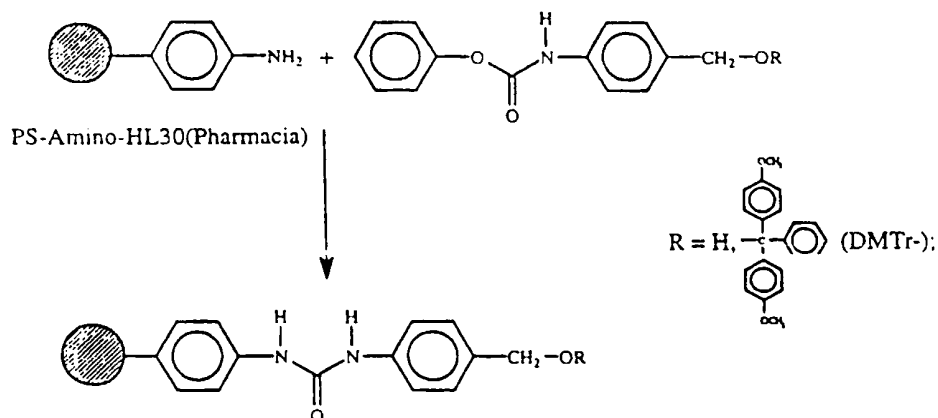
Name	- X (- R)	Träger- material	Versuchs- nummer	Beladungs- nummer	Bedingungen	Capping	Beladungs- zahl
PS-NH ₂ - Aminohexane	- NH (- H)	PS-Amino- HL30	—	277	500 mg (71,5 μmol) Träger; 50 mg PCT (264 μmol); 24h/RT; 600 μmol 1,6- Diaminohexane 4,0 ml AcN/DMF(1/1) 60°C/12h	Ac ₂ O DMF Pyridin (0,5/5/2 ml) 500mg DMAP 10 min/RT	BPB: 102 μmol/g
PS-NH ₂ - Aminohexane	- NH (- H)	PS-Amino- HL30	—	V288.B4	1,024 g (144 μmol) Träger; 200 mg PCI (1053 μmol); 24 h/RT; 600 mg alkt. Träger+420 mg 1,6- Diaminohexane 12h/60°C	—	BPB : 188 μmol/g (?)
PS-NH ₂ - Methylaminohexane	-NH	PS-Amino- HL30	—	V312	1,031 g (145 μmol)Träger; 125 mg PCT (0,661 mmol); Aktivierung 3h/RT/10 ml AcN; 300 mg N, N'- Dimmethyl-1,6- hexanediamine; 16h /60°C	Ac ₂ O DMF Pyridin (0,5/5/2m l) 500mg DMAP 15 min/RT	BPB: 97 μmol/g

Reaktionsschema:



Name	X	Trägermaterial	Versuchsnummer (Spacer)	Beladungsnummer	Bedingungen	Capping	Beladungszahl
PS-NH ₂ -Thymidin-3',5'-MMTr	NH	PS-Amino-HL30	V210	V225	118 mg (17 µmol) Träger; 8,2 mg (8,4 µmol); 15h/60°C/1,5 ml AcN;	Ac ₂ O DMF Pyridin (0,1/1,0/0,5ml) 100 mg DMAP 60 min/RT	MMTr: 27 µmol/g
PS-NH ₂ -Jeffamine-Thymidin-3',5'-MMTr	NH	PS-NH ₂ -Jeffamine	V210/V232A	V240A	86mg V232A 7,8 mg (8,0 µmol) V210; 25h/60°C/1,0 ml AcN	---	MMTr: 15 µmol
PS-OH-Jeffamine-Thymidin-3',5'-MMTr	O	PS-OH-Jeffamine-Thymidin-3',5'-MMTr	V210/V232B	V240B	60 mg V232B 7,7 mg (7,9 µmol) V210; 25h/60°C/1,0 ml AcN	---	MMTr: 18 µmol

Reaktionsschema:



Name	R	Trägermaterial	Versuchsnummer	Beladungsnummer	Bedingungen	Capping	Beladungszahl
PS-NH ₂ -Benzylalkohol-OH	- H	PS-Amino-HL30	D744	310	500 mg (71,5 µmol) Träger; 80 mg (329 µmol=4,6 Moläquivalente) 20h/60-70°C in 5 ml CH ₃ CN	DMAP Ac ₂ O CH ₃ CN 30 min. RT	Indirekt über BPB 110 µmol/g
PS-NH ₂ -Benzylalkohol-ODMT	- DMTr	PS-Amino-HL30	V366-PI	----			

Vorteile des Spacermoleküls:

- Eine mögliche Nebenreaktion durch vicinale Hydroxyfunktionen wird vermieden.
- Die Beladung kann durch Anfärben der nicht abreagierten basischen Aminofunktionen über den Bromphenolblau (BPB)-Test ermittelt werden, insbesondere wenn $R = H$. Bei der tritylierten Variante kann die Beladung entweder über BPB oder nach dem Cappen über den Tritylwert bestimmt werden.
- Bei Beladung mit einem 3'-O-Phosphoramidit entstehen statt den säurelabilen Phosphorsäureamidaten die stabileren Phosphorsäurediester¹. Dies ist im Hinblick auf die Verwendung von Safety-Catch-2'-O-Acetal-Linkern (Vergl. Anlage 5) von Vorteil!

¹ W. Bannwarth; Helv. Chim. Acta, Vol.71, 1517 (1988);

- 30 -

Literatur

- (2) Ronald Frank, Simultane kombinatorische Synthese: Moleküle nach Maß durch Screening aus der Vielfalt. In: GBF, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH Braunschweig, wissenschaftlicher Ergebnisbericht, (1993) 5 - 16.
- (5B) Frank & Döring in Tetrahedron, 44 (1988) 6031 - 6040
- (5C) Frank et al in Nucleic Acids Res., 11 (1983) 4365 - 4377
- (6) Bray et al in Tetrahedron Letters, 40 (1990) 5811 - 5814
- (7) Hoffmann & Frank in Tetrahedron Letters, 42 (1994) 7763 - 7766
- (8) DE P 43 20 260.8; DE 44 31 317.9; PCT/EP 94/01896
- (9A) EP 85 110 454.7 = 0 174 525
- (14) Jung & Beck - Sickinger in Angew. Chem., 104 (1992) 375 - 500
- (15) Frank in Bioorg. Med. Chem. Letters, 3 (1993) 425 - 430.
- (16) Lashkari et al in PNAS, 92 (1995) 7912 - 7915
- (17A) Moraj et al in Biochem. J. 316 (1996) 193 - 199
- (17B) Deibel et al in Peptide Res., 2 (1989) 189 - 194

Ansprüche

1. Vorrichtung für eine automatisierte simultane chemische Synthese und fakultative Aufreinigung einer Vielzahl von Produkten an der Festphase, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Vielzahl, insbesondere 10 bis 100, vorzugsweise 48 oder ein Vielfaches davon, und vorzugsweise 400, von separaten, nach oben und unten offenen Reaktionsgefäßen bzw. Reaktoren als parallel in einem Block bzw. Reaktorblock (Figur 6) angeordnete Kanäle (bzw. Reaktionskanäle) oder Säulen (bzw. Reaktionssäulen), insbesondere kleine Säulen, vorgesehen sind, die entweder gemeinsam oder einzeln entnehmbar sind; in den Kanälen bzw. Säulen Trägermaterial für die Synthese (Festphase) entweder zwischen zwei inerte poröse Frittenböden oder selbst als chemisch modifizierte Fritten- oder Filterböden eingebracht ist, so daß von oben zugegebene flüssige Medien allein durch die Oberflächenspannung und

- 32 -

Benetzung des Trägermaterials im Reaktor bzw. in den Reaktionsgefäßen festgehalten werden können; und gegebenenfalls eine Inertgasversorgung vorgesehen ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Block bzw. Reaktorblock, auf eine Wanne aufgesetzt ist, die über ein schaltbares Ventil an eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, so daß flüssige Medien aus den Reaktionsgefäßen bzw. Reaktoren und den darin enthaltenen Trägermaterialien simultan abgesaugt werden können.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die oberen Eingänge der Säulen bzw. Reaktionssäulen im Reaktorblock durch eine darüber angebrachte Lochblende oder ein darüber angebrachtes Prallblech abgedeckt sind, so daß die Reaktionssäulen mit einem Inertgas, insbesondere Stickstoff oder Argon, geflutet werden können und der Inertgasstrom gegebenenfalls während des Absaugvorganges deutlich erhöht werden kann; oder daß der Raum über den Reaktionssäulen bzw. Reaktionskanälen durch eine verschiebbare Lochblende gezielt verschlossen werden kann, so daß die Reagenzien mit Inertgasüberdruck aus den Reaktionssäulen oder Reaktionskanälen ausgeblasen werden können.
4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Vorrichtung mit einem xyz-Pipettierroboter, mit elektronisch steuerbaren Dosierspritzen (Dilutoren) mit einer oder mit mehreren Dosiernadeln und gegebenenfalls zusätzlich mit einem oder mit mehreren Dosierkämmen versehen ist, so daß chemische Bausteine, Reagenzien und Lösungsmittel auf die Reaktionsgefäße verteilt werden können und jeder Reaktor einzeln adressierbar ist.

5. Vorrichtung nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß jede Dosiernadel mit mehreren, mindestens mit zwei, an separate Dosierspritzen angeschlossenen und damit getrennt befüllbaren inneren Kanälen versehen ist, deren Enden sich erst kurz vor dem Auslaß treffen (Fig. 8), so daß bei simultaner Dosierung mehrerer Reagenzien das Mischen erst kurz vor der Abgabe in der Spitze der Dosiernadel erfolgt; wobei gegebenenfalls ein Kanal auch an die Inertgasversorgung angeschlossen sein kann, so daß über ein Inertgaspuls das Mischvolumen ausgedrückt werden kann.
6. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Dosiernadeln in der Längsachse federnd gelagert sind, so daß die Dosiernadeln auf das Trägermaterial oder die Deckfritten in den Reaktorkanälen aufgesetzt und so auch kleinste Volumina bis herunter zu 1 Nanoliter sicher abgesetzt werden können.
7. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** mit Septen verschlossene Gefäße, die in einem vom Reaktionsblock getrennten Reagenzienblock für eine Vielzahl, insbesondere 2 bis 100 und vorzugsweise 24, chemische Bausteine und Reagenzien vorgesehen sind.
8. Vorrichtung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hälse der Gefäße im Reaktorblock mit Septen verschlossen und durch eine darüber angebrachte Lochblende, insbesondere ein Prallblech, abgedeckt sind, so daß sie mit Inertgas, vorzugsweise mit Stickstoff oder Argon, geflutet werden können.

- 34 -

9. Vorrichtung nach Anspruch 4 oder 5, **gekennzeichnet durch** Transferports, die entweder direkt oder über schaltbare Ventile mit Vorratsgefäßen bzw. Vorratsflaschen verbunden sind (Fig. 6), wobei diese Vorratsgefäße gegebenenfalls mit einem geringen Überdruck beaufschlagbar sind, so daß Reagenzien mit Dosiernadeln auch aus Transferports entnommen werden können.
10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere nach Anspruch 4, **gekennzeichnet durch** Solventflaschen, Dosierspritzen und ein oder mehrere Dosierkämme, so daß Lösungsmittel und/oder Reagenzien aus Solventflaschen mittels Dosierspritzen oder durch Inertgasüberdruck auch über einen oder mehrere Dosierkämme simultan auf mehrere Reaktoren reihenweise verteilt werden können.
11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trägermaterial eine Schicht im Reaktorkanal bildet, die gleichmäßig von aufgegebenen Reagenzien und/oder Lösungsmitteln allein durch die Schwerkraft durchströmt werden kann.
12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** einen Steuerungsrechner, der die Gesamtheit aller Produkte für ein Syntheseprogramm mit Hilfe einer Liste von ASCII-Worten einer Software, bei der die chemischen Bausteine (Monomere), die für den Aufbau der Produkte eingesetzt werden, als ASCII-Letter codiert sind und die Produkte so als Abfolge von Aufbaureaktionen (Monomereinbaureaktion) durch ASCII-Worte beschrieben sind, in Ventilschaltungs-, Dosierspritzenbewegungs- und Roboterarmbewegungsoperationen umsetzen kann, wobei jeder Monomerein-

- 35 -

bau aus einer Folge von mehreren Reaktionsschritten und Schaltungsoperationen bestehen kann.

13. Reaktor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** eine zum Reaktor bzw. zur Reaktorordnung komplementäre Anordnung von Affinitätssäulen (Fig. 9).
und/oder eine der Reaktorordnung komplementäre Anordnung von Auffanggefäßen.
14. Verfahren insbesondere unter Verwendung einer Vorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß für die kovalente Verknüpfung der Produkte mit Trägermaterial geeignete Verknüpfungsbausteine (Linker) vorgesehen werden, die eine selektive und schonende finale Abspaltung der Produkte erlauben, wobei insbesondere für die Synthese von oligomeren Verbindungen, insbesondere von Oligonucleotiden oder Peptiden, ein universeller Linker vorgesehen wird, an den auch die Bausteine der ersten Aufbaureaktion mit dem gleichen chemischen Reaktionstyp verknüpft werden können, der auch für die weiteren Aufbaureaktionen eingesetzt wird, wodurch für die ganze Synthese einer Verbindungsklasse nur ein Typ von Bausteinen gebraucht wird, insbesondere nur ein Nucleosid-3'-phosphoramidit für die Synthese von 3'-OH-Oligonucleotiden.
15. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Linker bei den finalen Abspaltungsreaktionen in an sich bekannter Weise erst in eine labile, aber noch intakte Form überführt wird (safety-catch-Linker), die dann durch eine milde chemische Behandlung, vorzugsweise eine pH-Veränderung, gespalten wird, wobei man insbesondere die kovalent fixierten Produkte einfach durch automatische Waschoperationen an Trägermaterial von chemischen Reagen-

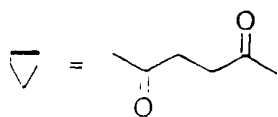
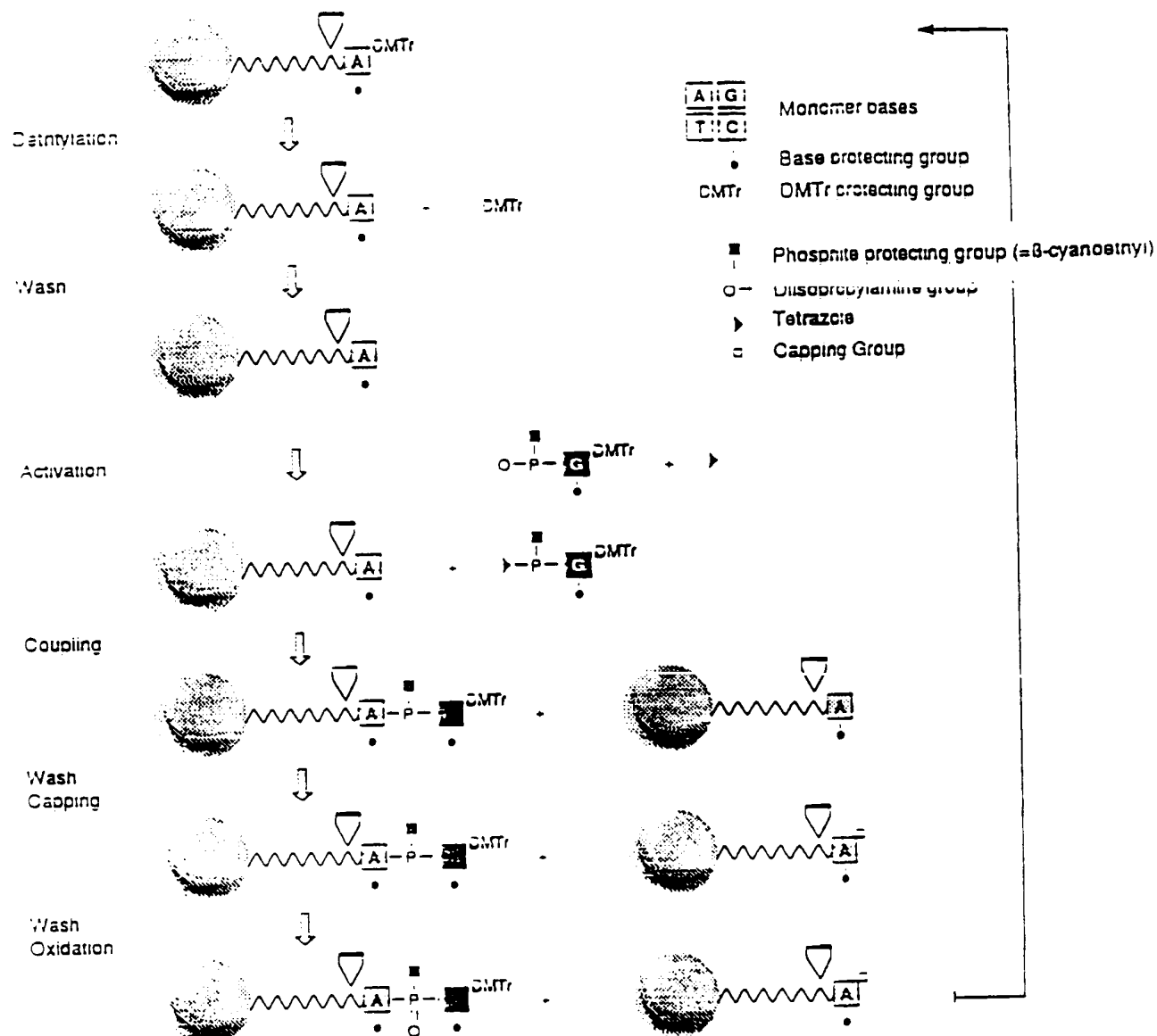
- 36 -

zien reinigt und erst ganz zum Schluß aus den Reaktoren in eine der Reaktoranordnung komplementäre Anordnung von Auffanggefäßen eluiert (Fig. 9).

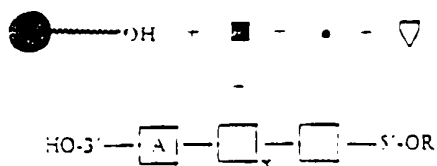
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zielprodukte der Synthesen mit einer als Affinitätslabel nutzbaren Gruppe versehen werden, über die die Zielprodukte an eine entsprechende Affinitätsphase gebunden werden können, wobei man insbesondere die aus den Reaktoren eluierten Produkte in eine der Reaktoranordnung komplementäre Anordnung von Affinitätssäulen (Fig. 9) überführt und durch automatisierte Waschoperationen von Nebenprodukten reinigt, wonach man die Zielprodukte durch automatisierte Wasch- oder Abspaltungsoperationen aus den Affinitätssäulen in eine der Reaktoranordnung komplementäre Anordnung von Auffanggefäßen eluiert.
17. Verfahren nach Anspruch 14, 15 oder 16, wobei man Affinitätssäulen mit Bindungskapazitäten verwendet, die derart limitiert sind, daß auch bei unterschiedlichen Syntheseausbeuten je Reaktor eine gleiche Mindestmenge an Zielprodukt gebunden und eluiert wird, so daß alle Produkte einer multiplen Synthese in äquimolaren Mengen erhalten werden können.

Synthese-Prinzip

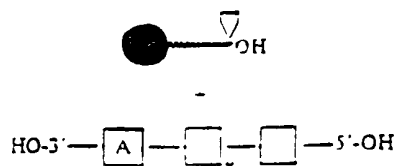
Fig. 1B



$\nabla =$ Safety-Catch-Linker



Reinigung



Applikation



PE from different Suppliers

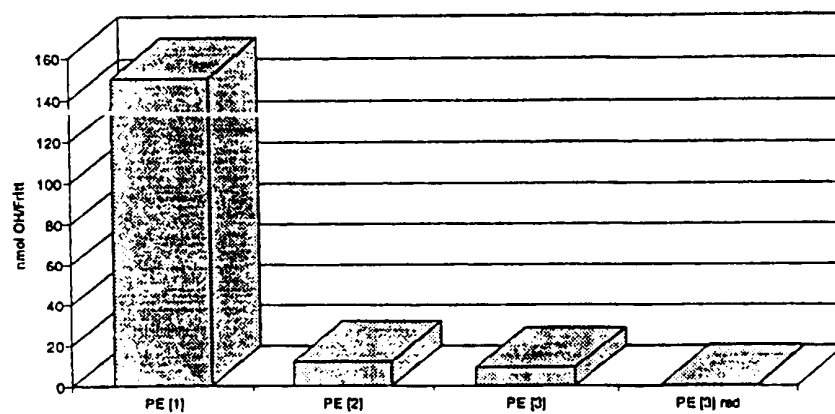


Abbildung 2: Reaktivität der Oberflächen verschiedener PE-Materialien im Tritylierungs-/Detritylierungstest; red. = reaktiv gesäubert.



PE Hydroxylierung

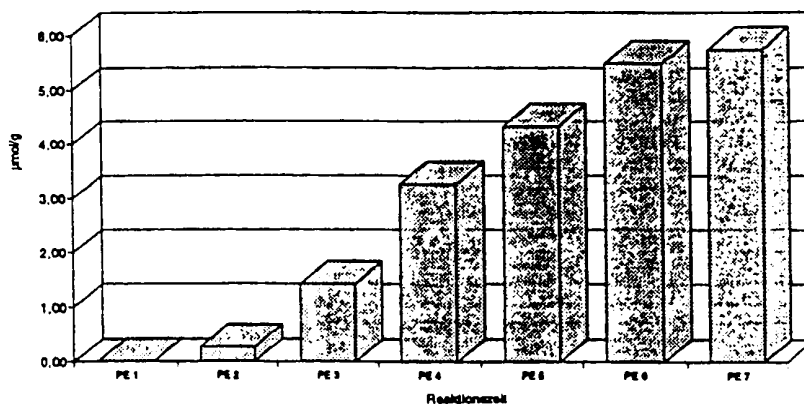


Abbildung 3: Gesteuerte Hydroxylierung von PE-Material.

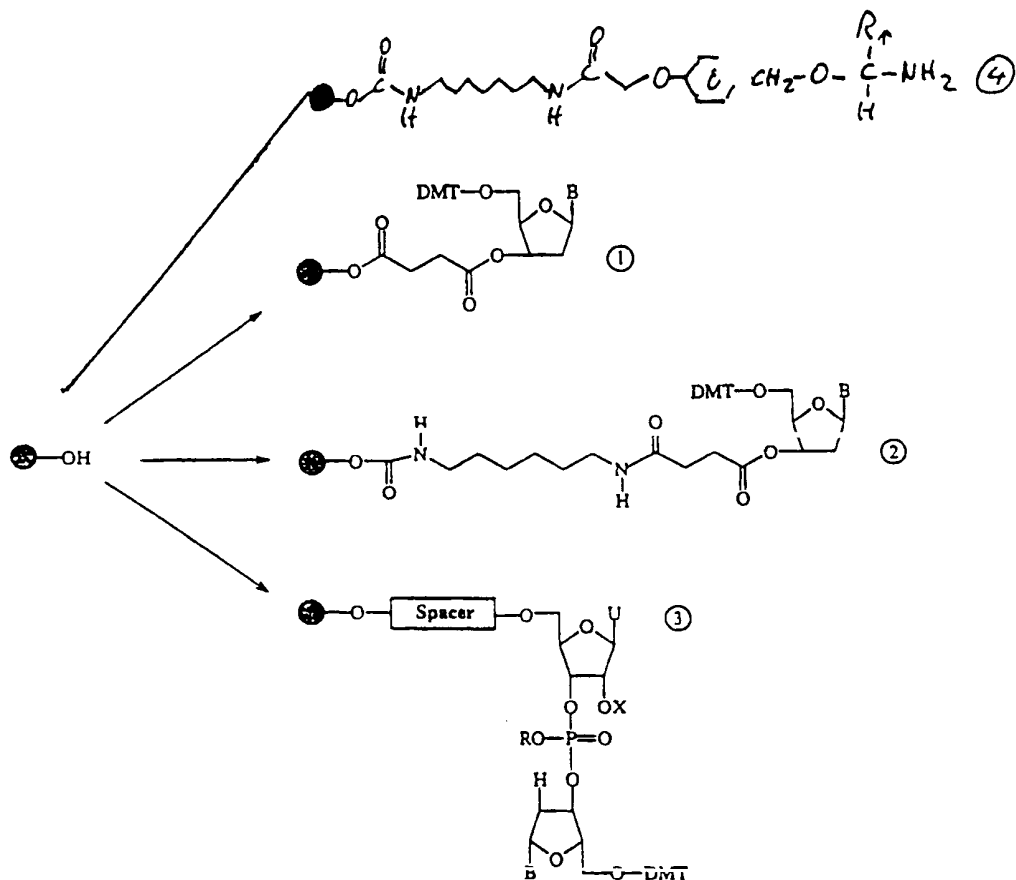


Abbildung 4: Beispiele für die in Abbildung 1 konzipierten modularen Syntheseträger. Ausgangsmaterial ist hydroxyliertes Polymer; 1 und 2 sind konventionelle Trägerbeladungen mit 3'-Nucleosidsuccinaten ohne und mit Spacer: 3 ist das Konzept des universellen Linkers (X = Acyl) und des "safety-catch"-Linkers (X = orthogonale Schutzgruppe) wobei das riboU-Nucleosid den Linker darstellt und nicht in das Oligonucleotid eingebaut wird. 4 ist ein Trägermaterial beladen für die Peptidsynthese

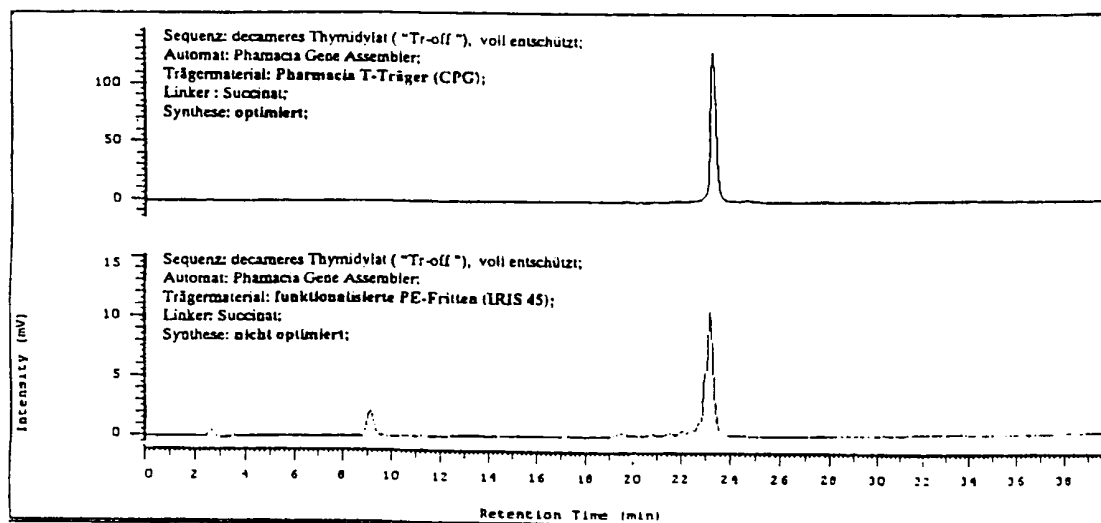
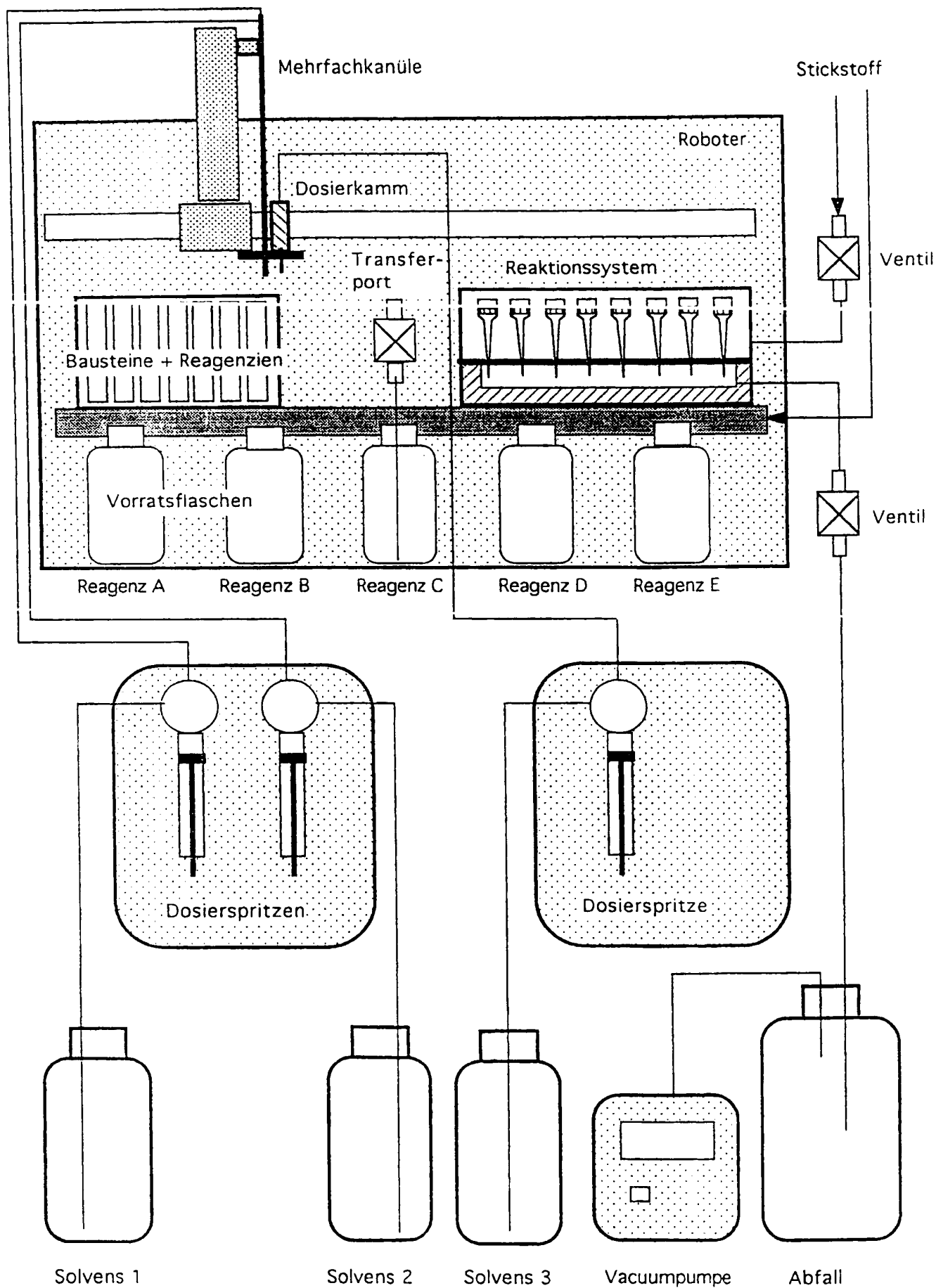
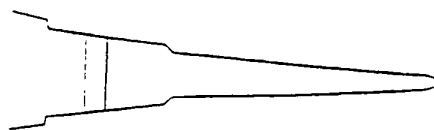


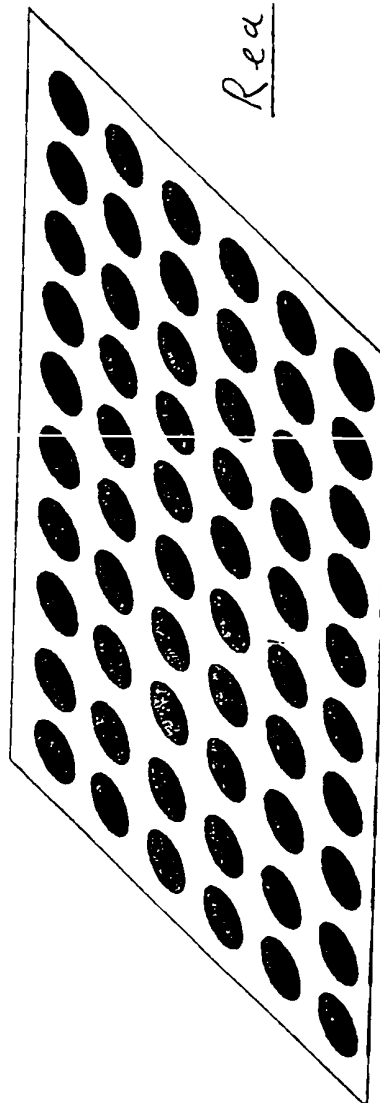
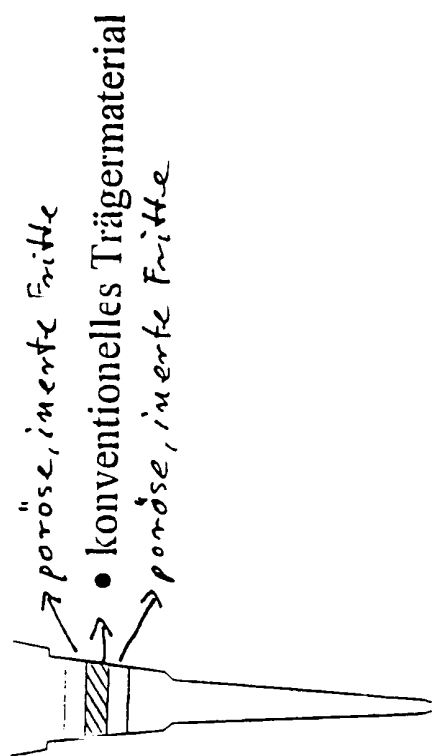
Abbildung 5: Beispiel für die Qualitäten von Oligonucleotid-Syntheseprodukten hergestellt in einem konventionellem Synthesizer auf konventionellem Trägerharz (oben) und auf PE-Fritzenmaterial derivatisiert nach Abb. 4 Typ 1.



Reaktoren

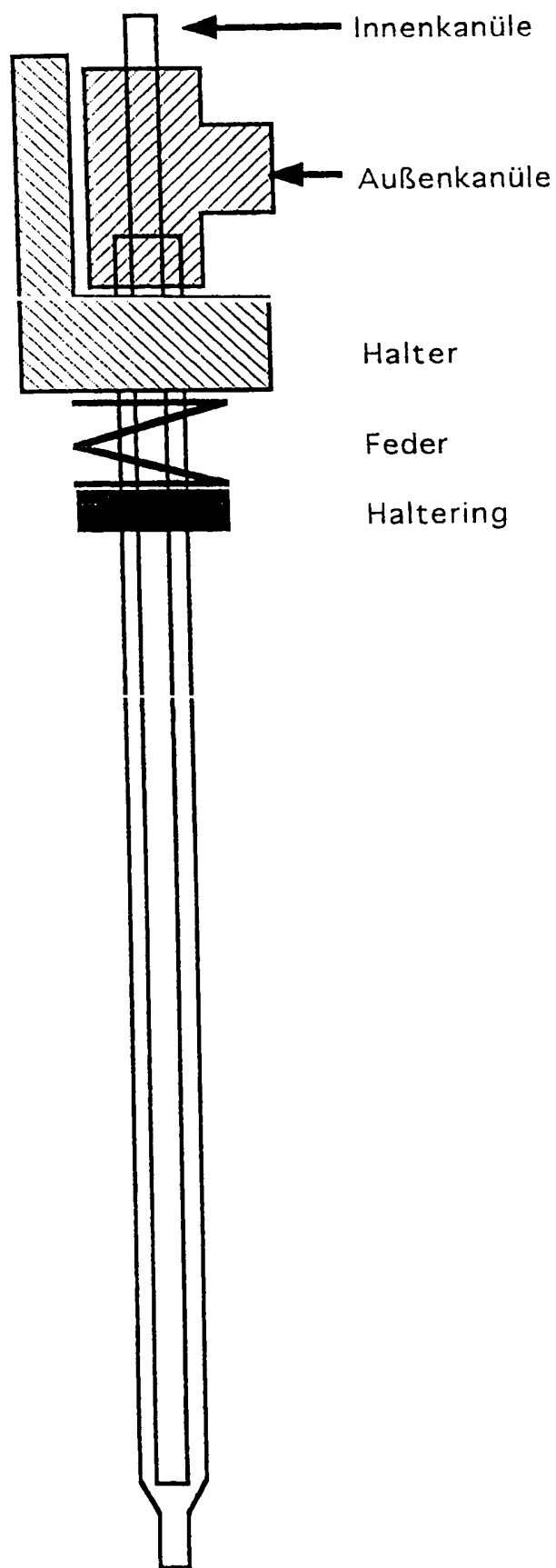


- Cellulose Papiere
- Poröse Fritten aus
PE, PP, PTFE usw. (Polyolefin)

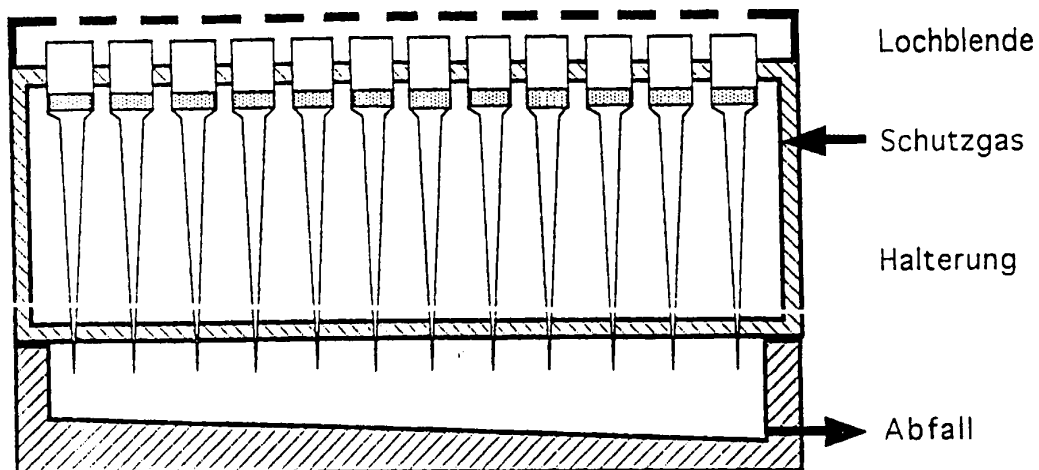


Reaktor anordnung

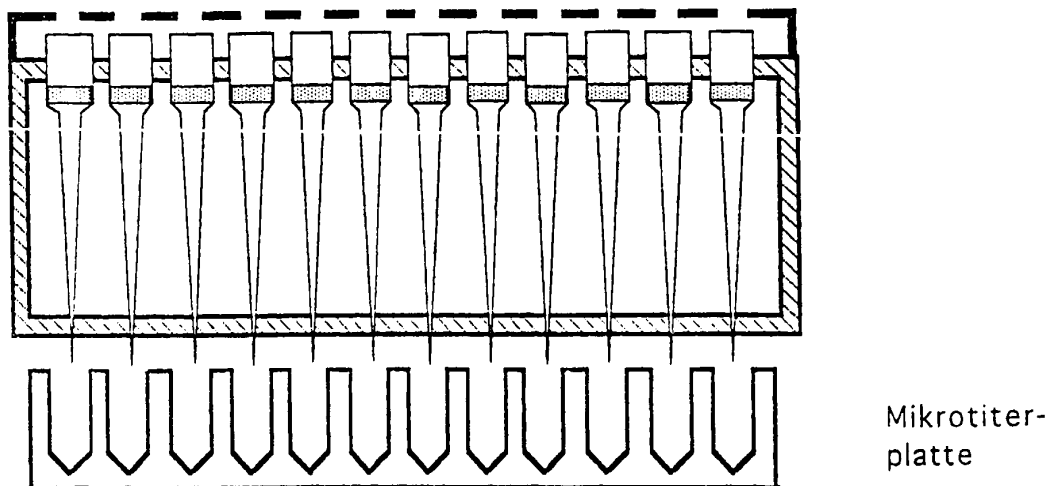
Doppelkanüle mit Federbelastung



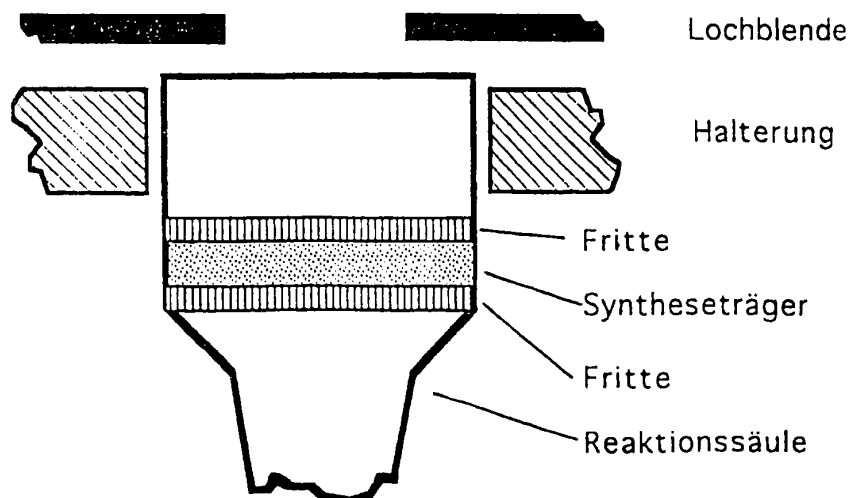
Reaktormodul im 8x12 Raster



Anordnung für Abspaltung und Aufreinigung



Detailansicht



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Ir Application No

PCT/EP 98/00901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01J19/00 C07H21/00 C07K1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01J C07H C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 18226 A (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 18 August 1994 see abstract see page 2, line 27 - page 4, line 19 see page 5, line 18 - page 12, line 12 see page 16, line 12 - line 28 see page 35, line 13 - line 29 see figures	1, 2, 4, 9, 11
Y	---	10, 12, 13
A	---	3
Y	EP 0 529 504 A (SHIMADZU CORPORATION) 3 March 1993 see abstract see page 3, line 21 - page 4, line 26 see figures 1-3	10
A	---	1-4, 7-9, 14-16

	-/--	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 June 1998

Date of mailing of the international search report

07/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stevnsborg, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 98/00901

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	US 5 243 540 A (STEPHEN A. VAN ALBERT ET AL.) 7 September 1993 see the whole document	12
A	---	1
Y	WO 90 02605 A (MORTEN MELDAL ET AL.) 22 March 1990 see abstract see page 12, line 30 - page 14, line 14 see page 15, line 14 - line 29 see page 17, line 10 - line 21 see page 22, line 23 page 24, line 2 see figures	13
A	---	1-4,7-11
X	WO 95 11262 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 27 April 1995 see abstract see page 7, line 19 - page 8, line 24 see page 18, line 16 - page 19, line 15 see page 20, line 3 - page 23, line 24 see figures	1,2,10,11
A	---	
A	DE 195 25 258 A (BERND STEINBRENNER) 16 January 1997 see the whole document	3
A	---	
A	JEAN E. RIVER & GARLAND R. MARSHALL (EDS.): "Peptides - Chemistry, Structure and Biology, Proc. 11th Am. Pept. Symp., 9-14 July 1989, La Jolla, CA, USA" 1990, ESCOM, LEIDEN, NL XP000371822 H. Gausepohl et al.: "Automated multiple peptide synthesis with BOP activation" see page 1003 - page 1004	4
A	---	
A	US 3 991 627 A (CLEVE WATROUS LAIRD & NOBORU MATSU) 16 November 1976 see the whole document	5-7
A	---	
A	STEPHAN HOFFMANN & RONALD FRANK: "A New Safety-Catch Peptide-Resin Linkage for the Direct Release of Peptides into Aqueous Buffers" TETRAHEDRON LETTERS., vol. 35, no. 42, 1994, OXFORD GB, pages 7763-7766, XP000653711 cited in the application see the whole document	14-16

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/EP 98/00901

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANTHONY V. LEMMO ET AL.: "Characterization of an Inkjet Chemical Microdispenser for Combinatorial Library Synthesis" ANALYTICAL CHEMISTRY., vol. 69, no. 4, 15 February 1997, COLUMBUS US, pages 543-551, XP000681609 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No

PCT/EP 98/00901

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9418226 A	18-08-1994	US 5368823 A EP 0683790 A JP 8506813 T US 5541314 A	29-11-1994 29-11-1995 23-07-1996 30-07-1996
EP 529504 A	03-03-1993	JP 2007165 C JP 5049914 A JP 7020546 B DE 69225441 D US 5395594 A	11-01-1996 02-03-1993 08-03-1995 18-06-1998 07-03-1995
US 5243540 A	07-09-1993	NONE	
WO 9002605 A	22-03-1990	AU 4215389 A	02-04-1990
WO 9511262 A	27-04-1995	US 5472672 A CA 2174648 A EP 0734397 A JP 9507505 T US 5529756 A	05-12-1995 27-04-1995 02-10-1996 29-07-1997 25-06-1996
DE 19525258 A	16-01-1997	NONE	
US 3991627 A	16-11-1976	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 B01J19/00 C07H21/00 C07K1/04

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 B01J C07H C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 94 18226 A (UNIVERSITY OF GEORGIA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 18. August 1994 siehe Zusammenfassung siehe Seite 2, Zeile 27 - Seite 4, Zeile 19 siehe Seite 5, Zeile 18 - Seite 12, Zeile 12 siehe Seite 16, Zeile 12 - Zeile 28 siehe Seite 35, Zeile 13 - Zeile 29 siehe Abbildungen	1, 2, 4, 9, 11
Y		10, 12, 13
A	---	3
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Juni 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/07/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stevnsborg, N

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 529 504 A (SHIMADZU CORPORATION) 3.März 1993 siehe Zusammenfassung siehe Seite 3, Zeile 21 - Seite 4, Zeile 26 siehe Abbildungen 1-3	10
A	---	1-4,7-9, 14-16
Y	US 5 243 540 A (STEPHEN A. VAN ALBERT ET AL.) 7.September 1993 siehe das ganze Dokument	12
A	---	1
Y	WO 90 02605 A (MORTEN MELDAL ET AL.) 22.März 1990 siehe Zusammenfassung siehe Seite 12, Zeile 30 - Seite 14, Zeile 14 siehe Seite 15, Zeile 14 - Zeile 29 siehe Seite 17, Zeile 10 - Zeile 21 siehe Seite 22, Zeile 23 - Seite 24, Zeile 2 siehe Abbildungen	13
A	---	1-4,7-11
X	WO 95 11262 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 27.April 1995 siehe Zusammenfassung siehe Seite 7, Zeile 19 - Seite 8, Zeile 24 siehe Seite 18, Zeile 16 - Seite 19, Zeile 15 siehe Seite 20, Zeile 3 - Seite 23, Zeile 24 siehe Abbildungen	1,2,10, 11
A	---	
A	DE 195 25 258 A (BERND STEINBRENNER) 16.Januar 1997 siehe das ganze Dokument	3
A	---	
A	JEAN E. RIVER & GARLAND R. MARSHALL (EDS.): "Peptides - Chemistry, Structure and Biology, Proc. 11th Am. Pept. Symp., 9-14 July 1989, La Jolla, CA, USA" 1990, ESCOM, LEIDEN, NL XP000371822 H. Gausepohl et al.: "Automated multiple peptide synthesis with BOP activation" siehe Seite 1003 - Seite 1004	4
10	A	
	US 3 991 627 A (CLEVE WATROUS LAIRD & NOBORU MATSU) 16.November 1976 siehe das ganze Dokument	5-7
2	---	
	--- -/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	STEPHAN HOFFMANN & RONALD FRANK: "A New Safety-Catch Peptide-Resin Linkage for the Direct Release of Peptides into Aqueous Buffers" TETRAHEDRON LETTERS., Bd. 35, Nr. 42, 1994, OXFORD GB, Seiten 7763-7766, XP000653711 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	14-16
A	ANTHONY V. LEMMO ET AL.: "Characterization of an Inkjet Chemical Microdispenser for Combinatorial Library Synthesis" ANALYTICAL CHEMISTRY., Bd. 69, Nr. 4, 15. Februar 1997, COLUMBUS US, Seiten 543-551, XP000681609 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Ar des Aktenzeichen

PCT/EP 98/00901

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9418226 A	18-08-1994	US 5368823 A	29-11-1994
		EP 0683790 A	29-11-1995
		JP 8506813 T	23-07-1996
		US 5541314 A	30-07-1996
EP 529504 A	03-03-1993	JP 2007165 C	11-01-1996
		JP 5049914 A	02-03-1993
		JP 7020546 B	08-03-1995
		DE 69225441 D	18-06-1998
		US 5395594 A	07-03-1995
US 5243540 A	07-09-1993	KEINE	
WO 9002605 A	22-03-1990	AU 4215389 A	02-04-1990
WO 9511262 A	27-04-1995	US 5472672 A	05-12-1995
		CA 2174648 A	27-04-1995
		EP 0734397 A	02-10-1996
		JP 9507505 T	29-07-1997
		US 5529756 A	25-06-1996
DE 19525258 A	16-01-1997	KEINE	
US 3991627 A	16-11-1976	KEINE	